

# **Molekularbiologische und mikrobielle Studien zur enzymatischen Spaltung von Fucoidan**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Linda Kilian  
aus Peine

1. Referent: apl. Professor Dr. Siegmund Lang  
2. Referent: apl. Professor Dr. Hans-Joachim Jördening  
eingereicht am: 19.12.2011  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 13.04.2012

Druckjahr 2012

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

Kilian, L., Harder, B.-J., Hahn, T., Stadtmüller, R., Ulber, R. & Lang, S.: Isolation and Characterization of a Marine Microorganism degrading Fucoïdan from *Fucus vesiculosus*. Marine Biotechnology (in Vorbereitung)

## **Tagungsbeiträge**

Kilian, L., Wang, X., Fröhlich, A., Stadtmüller, R., Hahn, T., Ulber, R. & Lang, S.: Fucoïdanases, helpful tool for the characterisation of fucoïdan. (Vortrag) International Symposium on BioPolymers, Stuttgart (2010).

Kilian, L., Harder, B.-J., Wang, X., Hahn, T., Stadtmüller, R., Ulber, R. & Lang, S.: Production and Characterisation of a Fucoïdan-hydrolysing Enzyme from a Marine Microorganism. (Poster) 1st European Congress of Applied Biotechnology zusammen mit 29. DECHEMA-Jahrestagung, Berlin (2011).

Kilian, L., Wang, X., Hahn, T., Ulber, R. & Lang, S.: Fucoïdan und Fucoïdanase: Studien zur Isolierung und Charakterisierung. (Poster) DECHEMA-Jahrestagung, Aachen (2010).

Kilian, L., Holtkamp, A., Hahn, T., Ulber, R. & Lang, S.: Gewinnung sulfatierter Oligosaccharide aus Fucoïdan von *Fucus vesiculosus*. (Poster) Vortrags- und Diskussionstagung: "Biokatalyse: Neue Verfahren, neue Produkte", Bad Schandau (2009).

Holtkamp, A., Kilian L., Kelly, S., Buchholz, R., Tokuda, H., Ulber, R., & Lang, S.: *Fucus vesiculosus* as resource for medical applications – chances and obstacles -. (Poster) Biorefinica, Osnabrück (2009).

Holtkamp, A., Kilian L., Kelly, S., Buchholz, R., Tokuda, H., Ulber, R., & Lang, S.: Analysis of Diverse Bioactivities of Fucoïdan from *Fucus vesiculosus*. (Poster) European Bioperspectives, Hannover (2008).





## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Meinen ersten Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Siegmund Lang für die interessante Aufgabenstellung und die Unterstützung bei der Bearbeitung dieses Themas aussprechen.

Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. Dr. Jördening für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Herrn Prof. Dr. Krull danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ein besonderer Dank geht an Thomas Hahn und Ralf Stadtmüller für die angenehme Zusammenarbeit im Rahmen des Projektes.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik, Abteilung Biotechnologie danke ich für die tolle Unterstützung und Arbeitsatmosphäre, besonders Wolfgang Grassl, Andrea Walzog, Julika Wrenger, Verena Recke, Stefanie Wöhl-Bruhn, Ileana Jurchescu, Malte Ringleb und Lars Freund.

Ich möchte mich auch bei meiner Vorgängerin Andrea Holtkamp für die gute Vorbereitung und Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken.

Für die praktische Unterstützung möchte ich mich bei Eugenie Sibakina, Alexander Fröhlich, Björn-Johannes Harder und Andrea Schütte bedanken.

Kerstin Schreiber und Nelli Biel aus der Abteilung Bioinformatik des Instituts für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik danke ich für die Hilfe bei der Charakterisierung des Bakteriums.

Ein sehr großer Dank geht auch an meine Familie, für die Unterstützung und die Geduld, die sie mir entgegengebracht haben.

## Zusammenfassung

Das sulfatierte Polysaccharid Fucoidan, das aus Braunalgen extrahiert werden kann, besitzt einige interessante Bioaktivitäten. Es besteht hauptsächlich aus Fucose-Molekülen, die  $\alpha$ -1,3 oder  $\alpha$ -1,4-verknüpft und an den Positionen C2 bzw. C4 sulfatiert und teilweise mit weiteren Monosacchariden funktionalisiert sind (Cumashi *et al.*, 2007). Da es Hinweise in der Literatur gibt, dass auch sulfatierte Fucoidanabbauprodukte Bioaktivitäten zeigen, werden Enzyme benötigt, die natives Fucoidan (Molekulargewicht bis über 1 000 kDa) spalten (Pomin *et al.*, 2005).

Dies veranlasste uns, in Wilhelmshaven (Nordsee) die Braunalge *Fucus vesiculosus* (Blasentang) von einer Buhne zu sammeln und daraus Fucoidan zu extrahieren, dass enzymatisch gespalten werden sollte.

Für die Hydrolyse wurde in der vorliegenden Arbeit als erstes die endo-spaltende Fucoidanase FcnA, die Fucoidan aus den Algen *Pelvetia canaliculata* und *Ascophyllum nodosum* spaltet, aus dem Bakterium *Mariniflexile fucanivorans* (Descamps *et al.*, 2006) kloniert und rekombinant exprimiert. Jedoch konnten nur geringe Mengen an löslichem Protein produziert werden.

Der zweite Ansatz war, aus marinen Proben, die in Wilhelmshaven (Nordsee) genommen wurden, Bakterien zu isolieren, die Fucoidan abbauen können. Die Anreicherung erfolgte auf einem Nährmedium, dem das Polymer zugesetzt wurde. Unter den Isolaten, die hierbei positiv auffielen, befand sich das Bakterium MW-C3, das neben anderen Kohlenhydraten Fucoidan von *Fucus vesiculosus* als einzige Kohlenstoffquelle verwerten konnte, aber nicht das anders strukturierte Fucoidan von *Laminaria digitata*.

Die Charakterisierung von MW-C3 ergab, dass es sich um eine neue Art bzw. Gattung innerhalb der Familie der *Flavobacteriaceae* handelt. Die Übereinstimmung der Sequenzidentität der 16S rDNA lag bei weniger als 93 % zu bekannten Gattungen (*Tenacibaculum* und *Polaribacter*).

Das Bakterium MW-C3 zeigte die extrazelluläre Aktivität, Fucoidan in Oligosaccharide zu spalten, was durch die Zunahmen von niedermolekularen Polymerabbauprodukten in einer sogenannten Carbohydrate-PAGE (C-PAGE) nachgewiesen wurde.

Nach zahlreichen Schüttelkultur-Versuchen wurde MW-C3 in einem 3 l-Bioreaktor Maßstab kultiviert. Die anschließende Aufarbeitung des Kulturüberstands führte zu einer Enzymlösung, die für die enzymatische Spaltung von Fucoidan aus *Fucus vesiculosus* eingesetzt wurde. Die Abbauprodukte wurden mittels Gelpermeationschromatographie (GPC)

aufgereinigt und das Molekulargewicht der Oligosaccharide wurde auf ca. 1 bzw. 7 kDa bestimmt. Zusätzlich wurde durch Elementaranalyse ermittelt, dass etwa 80 % der Fucoseeinheiten eine Sulfatierung aufwiesen.

## Abstract

The sulphated polysaccharide fucoidan, which can be extracted from brown algae, exhibits numerous interesting bioactivities. It mainly consists of fucose molecules, which are  $\alpha$ -1,3 and  $\alpha$ -1,4 linked and substituted with sulphate groups at position C2 and C4 and partially functionalized with further monosaccharides (Cumashi *et al.*, 2007).

Because evidence in literature assumes, that even sulphated degradation products show bioactivities, enzymes, that are capable to cleave native fucoidan (molecular weight is more than 1,000 kDa) are needed (Pomin *et al.*, 2005).

Therefore the alga *Fucus vesiculosus* (bladder wrack) was collected at the shore in Wilhelmshaven (North Sea) and Fucoidan was extracted for the purpose of enzymatic hydrolysis.

The first approach in the work at hand was to clone and recombinantly express the endo-active fucoidanase FcnA from the bacterium *Mariniflexile fucanivorans*, that hydrolyses fucoidan from *Pelvetia canaliculata* and *Ascophyllum nodosum* (Descamps *et al.*, 2006). However only small amounts of protein were thus produced.

Additionally marine samples taken from the shore at Wilhelmshaven (North Sea) were used to isolate bacteria, which were able to degrade fucoidan. The enrichment was performed with medium containing the polymer as supplement. Among the isolates that positively stood out was MW-C3, which was able to grow on fucoidan from *Fucus vesiculosus* as sole carbon source, but not on fucoidan from *Laminaria digitata*.

The characterization of MW-C3 concluded that this strain might be a new species or rather a new genus within the family of *Flavobacteriaceae*. The sequence identity of the 16S rDNA was less than 93 % to known genera (*Tenacibaculum* and *Polaribacter*).

The bacterium MW-C3 showed an extracellular activity to cleave fucoidan into oligosaccharides of heterologous size, which was verified by the so-called Carbohydrate-PAGE (C-PAGE).

After experiments in shaking flask scale, MW-C3 was cultivated in a 3 l-bioreactor scale. The subsequent concentration of the cultivation supernatant resulted in an enzyme solution, which was employed for the enzymatic cleavage of fucoidan from *Fucus vesiculosus*. The resulting cleavage products were purified by gel permeation chromatography (GPC) and the molecular weight was determined to be approx. and 7 kDa. Elemental analysis concluded that about 80 % of fucose units were sulphated.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung.....</b>	<b>i</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>ii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>iv</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>v</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Algen als industrielles Produkt .....	1
1.2 Hochmolekulare Inhaltsstoffe von Algen .....	1
1.2.1 Agar .....	2
1.2.2 Alginat .....	2
1.2.3 Carrageenan .....	3
1.3 Fucoidan .....	4
1.3.1 Vorkommen und Charakteristika von Fucoidan .....	5
1.3.2 Fucane aus marinen Invertebraten .....	10
1.3.3 Bioaktivität von Fucoidan und Fucan .....	12
1.4 Hydrolyse von Fucoidan .....	13
1.4.1 Chemische Hydrolyse von Fucoidan .....	14
1.4.2 Enzymatische Hydrolyse durch Fucoidanasen/Fucosidasen .....	14
1.4.3 <i>Mariniflexile fucanivorans</i> SW 5 .....	18
1.5 Molmassenbestimmung mithilfe von Gelpermeationschromatographie .....	18
1.5.1 Standardkalibrierung .....	19
1.5.2 Universelle Kalibrierung .....	22
1.6 Ziel der Arbeit .....	23
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1 Bakterienstämme .....	24
2.2 Plasmide .....	24
2.3 Enzyme .....	24
2.4 Antikörper .....	25
2.5 Oligonukleotide .....	25
2.6 Puffer und Lösungen .....	25
2.7 Kit-Systeme .....	27
2.8 Laborgeräte und Zubehör .....	27
2.9 Computerprogramme und Datenbanken .....	28
2.10 Chemikalien .....	28
2.11 Nährmedien und Supplemente .....	28
2.12 Extraktion Fucoidan .....	31
2.13 Kulturführung .....	32
2.13.1 Stammhaltung in Glycerinkulturen .....	32
2.13.2 Stammhaltung auf Agarplatten .....	33
2.13.3 Vorkultur .....	33
2.13.4 Hauptkultur im Schüttelkolben .....	33
2.13.5 Kultivierung im Bioreaktormaßstab .....	33
2.14 Bestimmung der Kultivierungsparameter .....	34
2.14.1 Bestimmung der OD <sub>600</sub> von Bakterienkulturen .....	34
2.14.2 Test auf reduzierende Enden von Zuckern .....	34
2.14.3 Trübungstest nach Kitamikado .....	34

2.15	Molekularbiologische Methoden.....	35
2.15.1	Isolierung genomischer DNA aus Bakterien .....	35
2.15.2	Präparation von <i>E. coli</i> Plasmid-DNA.....	35
2.15.3	Amplifikation von DNA via PCR.....	35
2.15.4	Restriktionsverdau .....	36
2.15.5	Dephosphorylierung endständiger 5'-DNA-Phosphatgruppen .....	36
2.15.6	Ligation von DNA-Fragmenten.....	36
2.15.7	Agarose-Gelelektrophorese .....	37
2.15.8	Sequenzierung von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA (Sanger <i>et al.</i> , 1977).....	37
2.15.9	Herstellung chemokompetenter Zellen.....	37
2.15.10	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen mittels Hitzeschock .....	38
2.15.11	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> und Zellaufschluß .....	38
2.15.12	Aufreinigung des rekombinanten Proteins mit Ni-Sepharose .....	39
2.15.13	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.15.14	Westernblot/Immunoblot.....	40
2.16	Isolierung mariner Bakterien.....	41
2.16.1	Screening nach fucoidanabbauenden Mikroorganismen .....	41
2.17	Sequenzierung der 16S rDNA.....	42
2.18	Biochemische und Phänotypische Charakterisierung von MW-C3 .....	42
2.18.1	Phänotypische Charakterisierung mit Biolog® Phenotype MicroArrays™ .....	42
2.18.2	Anforderung an den Salzgehalt des Mediums .....	43
2.18.3	Bestimmung des pH Optimums.....	43
2.18.4	Bestimmung des Wachstums bei verschiedenen Temperaturen.....	44
2.18.5	API System (BioMérieux) .....	44
2.18.6	Katalase Aktivität .....	44
2.18.7	Oxidase Aktivität.....	44
2.18.8	Gram-Färbung.....	44
2.18.9	Anaerobe Kultivierung .....	45
2.18.10	Test für Flexirubin-Pigmente.....	45
2.19	Fucoidanase-Aktivitätstest .....	45
2.20	Carbohydrate – Polyacrylamid Gel Electrophoresis (C-PAGE) .....	45
2.21	HPLC-GPC.....	46
2.22	Ammoniumsulfatfällung zur Enzymisolierung.....	47
2.23	Anreicherung des Enzyms aus dem Kulturüberstand.....	48
2.24	Enzymatische Spaltung von Fucoidan .....	48
2.24.1	Aufreinigung der Oligosaccharide.....	48
2.24.2	Toluidin Blue-Nachweis von sulfatierten Polysacchariden.....	48
2.25	Elementaranalyse.....	49
2.25.1	Infrarotspektrometrie .....	49
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
3.1	Produktion einer Fucoidanase FcnA aus <i>Mariniflexile fucanivorans</i> .....	50
3.1.1	Expression von Fucoidanase <i>fcnA</i> in pET21a(+). .....	50
3.1.2	Expression von Fucoidanase FcnA in pET21a(+)- <i>pelB</i> .....	52
3.2	Isolierung mariner Mikroorganismen mit Fucoidanase-Potenzial .....	56
3.2.1	Wachstumseigenschaften verschiedener Mikroorganismen mit potentieller Fucoidanase-Aktivität .....	58
3.3	Charakterisierung des bakteriellen Isolats MW-C3 .....	60
3.3.1	Sequenzierung der 16S rDNA .....	61
3.3.2	Phänotypische und biochemische Charakterisierung .....	64
3.4	Wachstum und Fucoidanase-Aktivität des marinen Isolats MW-C3 .....	68
3.4.1	Studien zum Wachstum von MW-C3.....	68

3.4.2	Charakterisierung der Fucoidanaseaktivität .....	74
3.5	Maßstabsvergrößerung der Kultivierung des Isolats MW-C3 und Spaltung des Fucoidans aus <i>Fucus vesiculosus</i> .....	83
3.5.1	MW-C3: Up-scaling der Kultivierung und des Nachweises von Fucoidanabbau .....	83
3.5.2	Enzymatische Hydrolyse von Fucoidan aus <i>Fucus vesiculosus</i> .....	87
3.5.3	Molekulargewichtsbestimmung durch GPC-Viskosimetrie .....	89
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>93</b>
4.1	Produktion von Fucanase FcnA aus <i>Mariniflexile fucanivorans</i> .....	94
4.2	Isolierung und Kultivierung eines marinen Bakteriums mit Potenzial zur Fucoidan-Spaltung .....	96
4.3	Vergleich bekannter fucoidanabbauender Bakterien mit dem bakteriellen Isolat MW-C3 .....	106
<b>5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>XIII</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>XVI</b>





# 1 Einleitung

## 1.1 Algen als industrielles Produkt

Im aquatischen Lebensbereich sind Algen weit verbreitet. Ihre Daseinsform reicht von einzelligen Mikroalgen (Cyanobakterien) bis zu meterlangen Makroalgen (*Macrocystis*). Sie besiedeln fast alle Bereiche des Wassers und gehören den Gruppen Rotalgen (*Rhodophyta*), Grünalgen (*Chloroplastida*), Blaualgen (*Glaucophyta*) und Braunalgen (*Phaeophyceae*) an.

Untersuchungen in Bezug auf ihre Verwandtschaftsbeziehungen ergaben, dass sich die Braunalgen schon sehr früh in der Evolution abgezweigt haben und enger mit Diatomeen verwandt sind als mit den restlichen Algenarten oder Landpflanzen, die direkt miteinander verwandt sind (Cock *et al.*, 2010).

Bereits seit Jahrhunderten werden Algen in einigen asiatischen Ländern sowohl als Nahrungsmittel als auch im medizinischen Bereich verwendet. Hauptsächlich dienen als Nahrungsquelle hierfür folgende Algen (McHugh, 2003):

- *Porphyra* spp. (Nori)
- *Monostroma* spp. und *Enteromorpha* spp. (Aonori)
- *Laminaria japonica* (Kombu/Haidai)
- *Undaria pinnatifida* (Wakame/Quandai-Cai)
- *Hizikia fusiforme* (Hiziki)
- *Cladosiphon okamurans* (Mozuku)
- *Palmeria palmata* (Dulse)
- *Chondrus crispus* (Knorpeltang)
- *Alaria esculenta*
- *Gracilaria* spp. (Ogo/Ogonori)

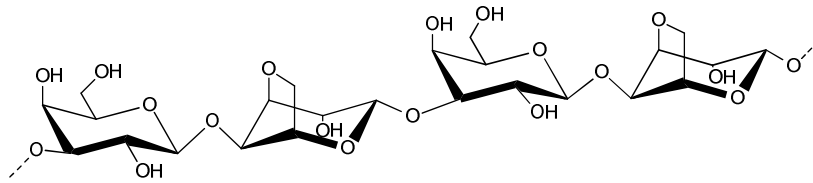
Durch die Globalisierung verstärkt sich die Verwendung von Algen als Nahrung und der Konsum von Algen nimmt zudem in den westlichen Ländern zu. Je nach Art werden die Algen geerntet oder in speziellen Verfahren kultiviert (abhängig von der Algenart), besonders in Japan, China und Vietnam (McHugh, 2003).

## 1.2 Hochmolekulare Inhaltsstoffe von Algen

Zusätzlich zu der direkten Verwendung der Algen als Nahrungsmittel werden aus ihnen für industrielle Zwecke drei wichtige Polysaccharide extrahiert: Agar, Alginat und Carrageenan. In den folgenden Abschnitten soll genauer auf die Herkunft und Nutzung eingegangen werden.

### 1.2.1 Agar

Das Polysaccharid Agar wird aus Rotalgen gewonnen und besteht aus Agarose und Agaropektin (Abbildung 1.1). Die lineare Grundstruktur von Agar besteht aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-galactopyranose. Im Jahr 2001 wurde geschätzt, dass für die Gewinnung von Agar insgesamt 55 650 t Algentrockengewicht produziert wurde. Hauptsächlich wurden *Gelidium* spp. (18 600 t), *Gracilaria* spp. (37 000 t) und zum geringen Teil *Pterocladia* spp. (50 t) zu diesem Zweck genutzt (McHugh, 2003).



**Abbildung 1.1: Struktur von Agarose, einem Bestandteil des Agars (Fu und Kim, 2010).**

Von den jährlich produzierten 77 600 t Agar, die einem Gesamtwert von 137 Millionen US\$ entsprechen, finden 90 % Anwendungen in der Nahrungsmittelindustrie. Der Rest wird in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt, beziehungsweise als besondere Applikation als Wachstumsgrundlage für Mikroorganismen oder in Form von Agarose für die Trennung von Makromolekülen insbesondere DNA verwendet (Fu und Kim, 2010; McHugh, 2003).

### 1.2.2 Alginat

Ein weiteres Polysaccharid, das industriell genutzt wird, ist Alginat und stammt aus Braunalgen. Alginat ist ein gelbildendes Polysaccharid, das in der Zellwand von Braunalgen gefunden werden kann. Alginat wird dabei als Natriumsalz extrahiert (insgesamt 36 100 t). Die Monomereinheiten sind  $\alpha$ -L-Guluronat (G) und  $\beta$ -D-Mannuronat (M) (Abbildung 1.2). Polymere Einheiten können aus homopolymeren G Blöcken Poly(G), homopolymeren M Blöcken, Poly(M) und heteropolymeren G/M Blöcken bestehen (Wong *et al.*, 2000).



**Abbildung 1.2: Monomereinheiten von Alginat:  $\alpha$ -L-Guluronat (G) und  $\beta$ -D-Mannuronat (M) (Gacesa, 1988).**

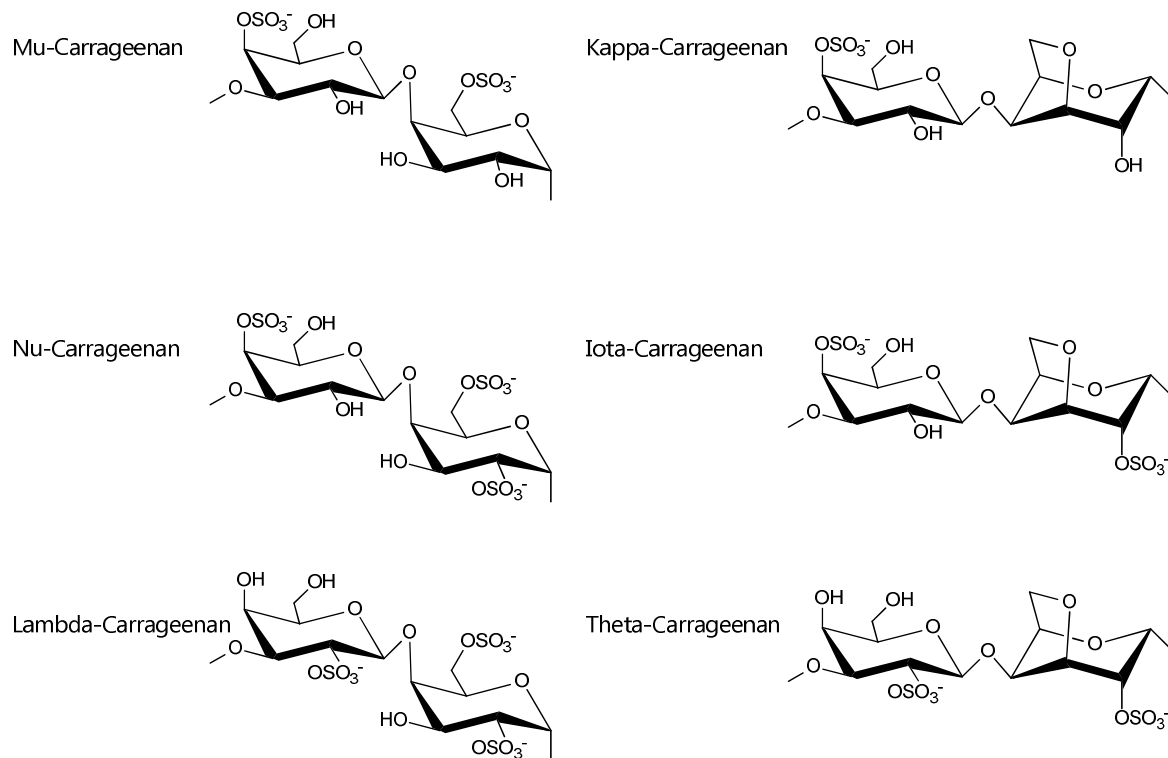
Der Anteil und die gewonnene Qualität hängt von der Algenart ab. Eine hohe Qualität wird aus den Gattungen *Ascophyllum*, *Durvillaea*, *Ecklonia*, *Laminaria* (*L. digitata*, *L. hyperborea*, *L. saccharina*), *Lessonia*, *Macrocystis*, *Sargassum* gewonnen. Allerdings werden *Sargassum* sp. nur genutzt, wenn keine weitere Quelle vorhanden ist, da dessen Qualität grenzwertig ist. Jährlich werden 125 000 t (Trockengewicht) geerntet. Ein Großteil der Ernte stammt aus *Laminaria* (34%) und *Macrocystis* (28%). Der Einsatz des Alginats im Vergleich zu Agar beschränkt sich nicht nur auf die Lebensmittelindustrie. Alginat wird zudem für die Textilindustrie, die Papierindustrie, für Immobilisierung von Biokatalysatoren, zum Schweißen, als Fischfutter, als Trennmittel und für den pharmazeutischen und medizinischen Gebrauch hergestellt. Der Gesamtwert des produzierten Alginats liegt bei 195 Millionen US\$ (McHugh, 2003).

### 1.2.3 Carrageenan

Ein ebenfalls aus Algen extrahiertes Polysaccharid ist das Carrageenan. Es ist ein lineares, sulfatiertes Polysaccharid bestehend aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-D-Galactose. Das Polysaccharid kann aus verschiedenen Varianten bestehen, die sich in ihren Strukturen und damit auch in ihren Eigenschaften unterscheiden. Von kommerziellem Interesse sind die Varianten Kappa ( $\kappa$ ), Iota ( $\iota$ ) und Lambda ( $\lambda$ ), darüber hinaus existieren die Formen Mu ( $\mu$ ), Nu ( $\nu$ ) und Theta ( $\theta$ ) (Abbildung 1.3).

Das meiste Carrageenan stammt aus Kultivierung von den Arten *Kappaphycus alvarezii* und *Euchema denticulatum* (insgesamt 149 000 t Algentrockengewicht). *Chondrus crispus* (3 900 t Algentrockengewicht) und *Gigartina* spp. (15 500 t Algentrockengewicht) steuern ebenfalls zu dem gesamten Algentrockengewicht (168 400 t), die für die Extraktion von Carrageenan genutzt werden, bei.

Es gibt eine breite Anwendung für das Polysaccharid mitunter in Milchprodukten, wasserbasierten Lebensmitteln, Fleischprodukten, Tierfutter, Lufterfrischern, Zahnpasta und immobilisierten Biokatalysatoren. Der Wert der rund 33 000 t produzierten Carrageenan, beläuft sich auf 300 Millionen US\$ (McHugh, 2003).



**Abbildung 1.3: Disaccharid-Struktur motive der vorhandenen Carrageenan-Varianten (Campo *et al.*, 2009)**

### 1.3 Fucoidan

Ein ebenfalls aus Braunalgen extrahierbares Polysaccharid ist Fucoidan. Jedoch besitzt es zurzeit im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Polysacchariden keine große industrielle Verwendung. Es findet allerdings Beachtung aufgrund vielfältiger Einflüsse auf die Gesundheit bei Nahrungszusatz und bei *in vitro* Bioaktivitäten.

In der Literatur gibt es einige Verwirrung was die Nomenklatur des Polysaccharids betrifft. Zu Beginn der Entdeckung bzw. Beschreibung des Polysaccharids wurde der Name „Fucoidin“ verwendet (Kylin, 1913). Jedoch wurde es im Jahr 1959 (Mcneely, 1959) zu „Fucoidan“ umbenannt um den Regeln für Kohlenhydrate zu entsprechen. Des Weiteren werden häufig die Namen „Fucan“ oder „sulfatiertes Fucan“ angeführt (Berteau und Mulloy, 2003). In dieser Arbeit werden die Begriffe nicht als synonym angesehen. Der Begriff **Fucoidan** wird für das Polysaccharid, welches aus Braunalgen gewonnen wird, benutzt. Das strukturell sehr ähnliche Polysaccharid aus marinen Invertebraten wird als **Fucan** bezeichnet. Diese Aufteilung der strukturell ähnlichen Polysaccharide erfolgt in Übereinstimmung mit der Verwendung durch Berteau und Mulloy (2003).

### 1.3.1 Vorkommen und Charakteristika von Furoidan

Allgemein versteht man unter Furoidan ein Polysaccharid aus  $\alpha$ -L-Fucose, mit unterschiedlichen Verknüpfungen, unterschiedlichen Graden an Verzweigung und/oder Sulfatierung. Je nach Herkunft können Homopolymere oder Heteropolymere, die aus weiteren Monosacchariden bestehen, vorhanden sein.

Das Polysaccharid konnte bis jetzt nur in Braunalgen (Furoidane) und marinen Invertebraten (Fucane) gefunden werden (Berteau und Mulloy, 2003).

Die erste Beschreibung von Furoidan erfolgte im Jahr 1913 unter der Bezeichnung Fucoidin; es wurde aus Braunalgen extrahiert (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* und *Laminaria digitata*) (Kylin, 1913).

Die Braunalgen gehören zu der Gruppe der *Phaeophyceae* mit insgesamt geschätzten 2.000 Arten, in 270 Gattungen und 13-18 Familien, die fast ausschließlich in der Nähe von steinigen Küsten anzutreffen sind. Sie kommen allgemein nur in marinen Gewässern vor; nur wenige Arten sind im Süßwasser beheimatet (Andersen, 1992; Phillips *et al.*, 2008). Die Online-Datenbank „[algaebase.org](http://algaebase.org)“ stellt eine umfassende Sammlung der Informationen über Algen dar. Dort findet man, dass die vier größten Ordnungen in dieser Gruppe die Dictyotales (219 Arten), Ectocarpales (631), Fuciales (521) und Laminariales (123) sind. Zwei bedeutende Ordnungen in Hinsicht auf die Extraktion von Furoidan sind die Laminariales und die Fuciales (siehe Tabelle 1.1). Die artenreichsten Familien in der Ordnung der Fuciales sind die *Fucaceae* (22 Arten) und die *Saragassaceae* (ca. 480 Arten). Vergleichbar sind in der Ordnung der Laminariales die Familien der *Laminariaceae* (59 Arten) und *Lessoniaceae* (31 Arten) (Guiry und Guiry, 2011). In Tabelle 1.1 sind die Arten von Braunalgen aufgeführt, aus denen bereits Furoidan extrahiert wurde.

Die verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb der *Phaeophyceae* wurden über Gensequenzen von Chloroplasten und nuklearen Genen etabliert. Das Ergebnis war, dass sich die Familie der Discosporangiales als erste abzweigte und die Familie der Fuciales die letzte sich verzweigende Familie war (Phillips *et al.*, 2008).

**Tabelle 1.1: Braunalgen, aus denen bereits Fucoidan extrahiert wurde,** erweitert nach (Berteau und Mulloy, 2003)

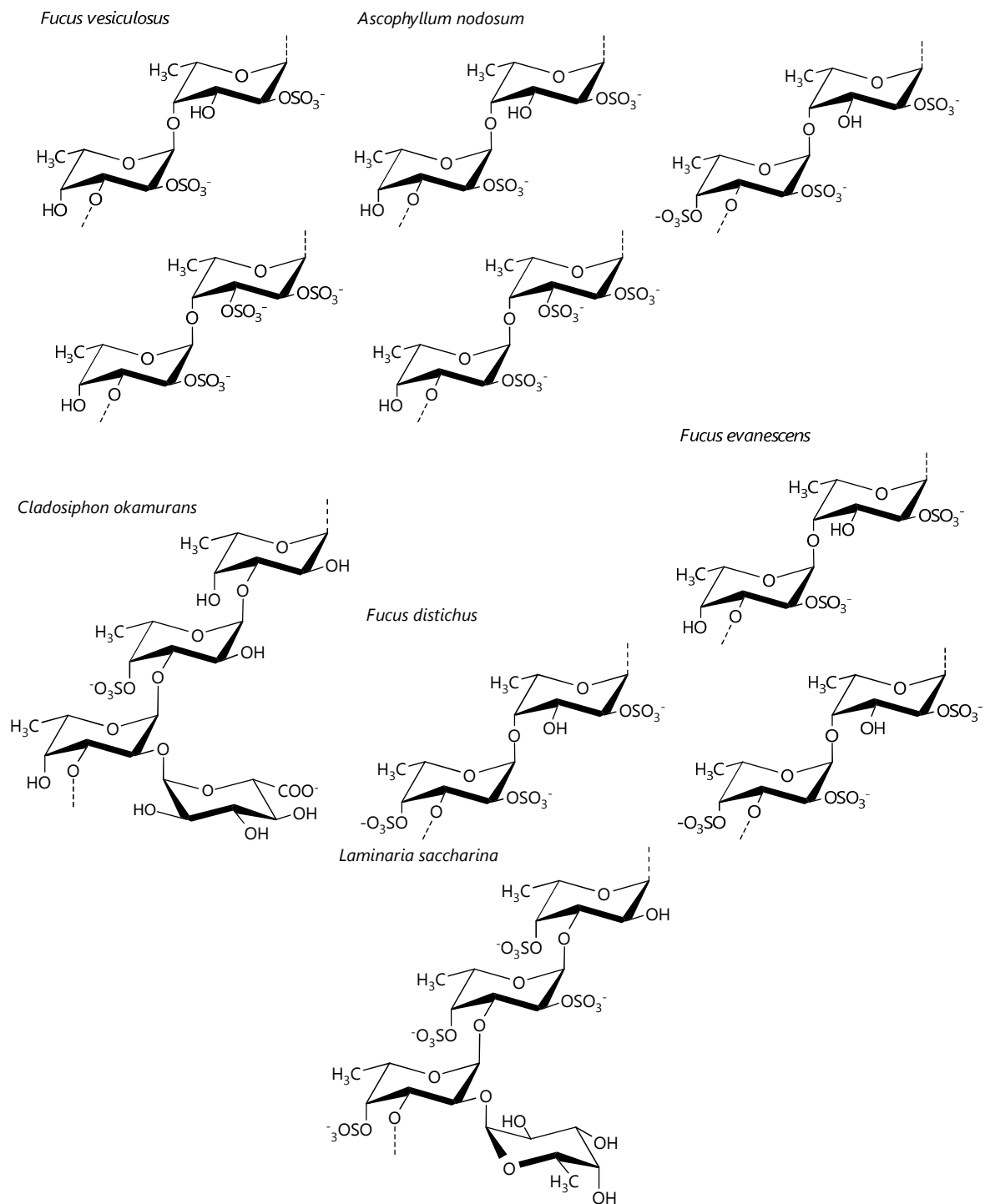
Art	Ordnung	Referenz
<i>Cladosiphon novae-caledoniae</i> , <i>C. okamurans</i>	Chordariales	Cumashi <i>et al.</i> (2007), Ye <i>et al.</i> (2005)
<i>Chordaria flagelliformis</i> , <i>Ch. gracilis</i>	Chordariales	Usov <i>et al.</i> (2001)
<i>Saundersella simplex</i>	Chordariales	Usov <i>et al.</i> (2001)
<i>Desmarestia intermedia</i>	Desmarestiales	Usov <i>et al.</i> (2001)
<i>Dictyosiphon foeniculaceus</i>	Dictyosiphonales	Usov <i>et al.</i> (2001)
<i>Dictyota dichotoma</i>	Dictyotales	Abdel-Fattah <i>et al.</i> (1978)
<i>Padina pavonica</i> , <i>P. gymnospora</i> , <i>P. tetrastromatica</i>	Dictyotales	Karmakar <i>et al.</i> (2010), Mian und Percival (1973), Rocha De Souza <i>et al.</i> (2007)
<i>Spatoglossum schroederi</i>	Dictyotales	Leite <i>et al.</i> (1998)
<i>Stoechospermum marginatum</i>	Dictyotales	Adhikari <i>et al.</i> (2006)
<i>Adenocystis utricularis</i>	Ectocarpales	Trinchero <i>et al.</i> (2009)
<i>Nemacystus decipiens</i>	Ectocarpales	Sakai <i>et al.</i> (2002)
<i>Pylayella littoralis</i>	Ectocarpales	Usov <i>et al.</i> (2001)
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Fucales	Chevolot <i>et al.</i> (1999)
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	Fucales	Mian und Percival (1973)
<i>Cystoseira indica</i>	Fucales	Mandal <i>et al.</i> (2007)
<i>Fucus vesiculosus</i> , <i>F. spiralis</i> , <i>F. serratus</i> , <i>F. evanescens</i> , <i>F. distichus</i>	Fucales	Usov <i>et al.</i> (2001)
<i>Himanthalia lorea</i>	Fucales	Mian und Percival (1973)
<i>Hizikia fusiforme</i>	Fucales	Li <i>et al.</i> (2006)
<i>Pelvetia canaliculata</i> , <i>P. wrightii</i>	Fucales	Mabeau und Kloareg (1987)
<i>Sargassum denticaprum</i> , <i>S. stenophyllum</i> , <i>S. horneri</i> , <i>S. kjellmaium</i> , <i>S. muticum</i> , <i>S. mcclurei</i> , <i>S. oligocytum</i> , <i>S. patens</i> , <i>S. polycystum</i> , <i>S. swartzii</i> , <i>S. tenerrimum</i>	Fucales	Bui <i>et al.</i> (2005), Mabeau und Kloareg (1987), Preeprame <i>et al.</i> (2001), Sinha <i>et al.</i> (2010)
<i>Turbinaria conoides</i>	Fucales	Chattopadhyay <i>et al.</i> (2010)
<i>Alaria fistulosa</i> , <i>A. marginata</i>	Laminariales	Usov <i>et al.</i> (2001)
<i>Arthrothamnus bifidus</i>	Laminariales	Usov <i>et al.</i> (2001)
<i>Chorda filum</i>	Laminariales	Chizhov <i>et al.</i> (1999)
<i>Ecklonia kurome</i> , <i>E. cava</i>	Laminariales	Tanaka und Sorai (1970)
<i>Eisenia bicyclis</i>	Laminariales	Yamamoto <i>et al.</i> (1984)
<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	Laminariales	Sakai <i>et al.</i> (2002)
<i>Laminaria angustata</i> , <i>L. brasiliensis</i> , <i>L. cloustoni</i> , <i>L. digitata</i> , <i>L. japonica</i> , <i>L. religiosa</i> , <i>L. saccharina</i> , <i>L. gurjanovae</i> , <i>L. longicuris</i>	Laminariales	Black <i>et al.</i> (1953), Kitamura <i>et al.</i> (1992), Rioux <i>et al.</i> (2007), Zvyagintseva <i>et al.</i> (2000)
<i>Lessonia vadosa</i> , <i>L. nigrescens</i>	Laminariales	Chandía und Matsuhira (2008), Sakai <i>et al.</i> (2002)
<i>Macrocystis integrifolia</i> , <i>M. pyrifera</i>	Laminariales	Schweiger (1962)
<i>Nereocystis luetkeana</i>	Laminariales	Berteau und Mulloy (2003)
<i>Undaria pinnatifida</i>	Laminariales	Kim <i>et al.</i> (2008)
<i>Analipus japonicus</i>	Scytosiphonales	Bilan <i>et al.</i> (2007)
<i>Petalonia fascia</i>	Scytosiphonales	Usov <i>et al.</i> (2001)
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	Scytosiphonales	Usov <i>et al.</i> (2001)

Da die Strukturen bzw. Struktur motive des Fucoidans sehr heterogen sind und es teilweise mehrere Struktur motive für die gleiche Algenart gibt, kann relativ wenig über das Verhältnis der Struktur zum Verwandtschaftsgrad gesagt werden (Cumashi *et al.*, 2007). Lediglich zwei grundsätzliche Struktur motive sind vorhanden. Zum einen gibt es eine  $\alpha$ -1,3 verknüpfte L-Fucose, wie z.B. in Laminariales (*Laminaria saccharina*) und Chordariales (*Chorda filum*),

zum anderen kommt in Fucales abwechselnd  $\alpha$ -1,3 und  $\alpha$ -1,4 verknüpfte L-Fucose vor (Chevolot *et al.*, 1999; Chizhov *et al.*, 1999).

Die Fucoideane weisen zudem einen hohen Grad an Verzweigung auf und können zusätzlich weitere Monosaccharide, Uronsäure oder Acetylierungen in den Molekülen besitzen (Usov *et al.*, 2001). Die Position der Sulfatierung ist häufig die C2-Position; darüber hinaus sind auch die C3- und C4-Positionen an einem Zuckermolekül möglich (Cumashi *et al.*, 2007). Das angegebene Molekulargewicht für verschiedene Fucoideane liegt zwischen 13 und 950 kDa (Holtkamp *et al.*, 2009) und hängt teilweise von der Extraktionsmethode ab.

In Abbildung 1.4 sind die Strukturformeln von Fucoideanen verschiedener Braunalgen abgebildet.



**Abbildung 1.4: Strukturen von Fucoidan aus verschiedenen Braunalgenarten (Cumashi et al., 2007)**

Der Gehalt des Fucoidans in den Algen wurde bereits in verschiedenen Untersuchungen erforscht. In allen bekannten Braunalgen wurden bislang Fucoidane gefunden, die teilweise über 40 % ihres Trockengewichts ausmachen können (Pomin und Mourao, 2008). Nach Obluchinskaya (2008) belaufen sich die Anteile von Fucoidan in den folgenden Algen auf 8 bis 16 % des Trockengewichts: *Fucus vesiculosus* (15,46 %), *Fucus serratus* (13,03 %),



*Fucus distichus* (14,67 %), *Ascophyllum nodosum* (11,36 %) und *Laminaria saccharina* (8,8 %).

Der Anteil des neutralen Polysaccharids Laminarin ( $\beta$ -1,3-D-Glukan), der als Speicherstoff dient, ist bei *L. saccharina* (11,63 %) teilweise um das 10-fache höher als bei den anderen aufgelisteten Algen (0,51 - 3,74 %) (Obluchinskaya, 2008).

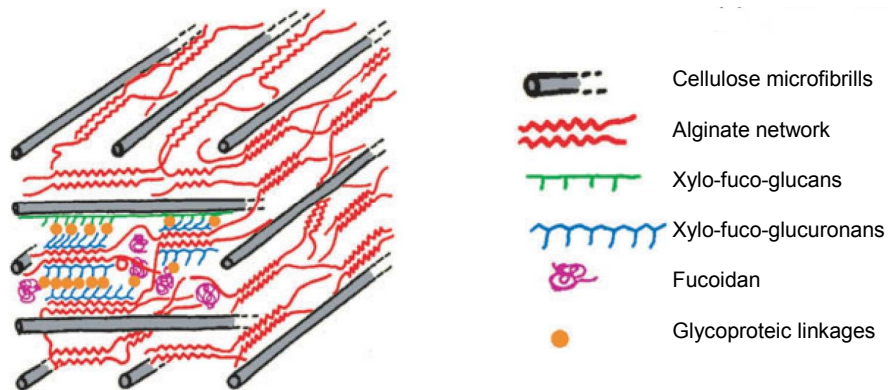
Grundsätzlich kann gesagt werden, dass *Fucaceae* wesentlich mehr Fucoidan enthalten als zum Beispiel *Laminariaceae*, die häufig einen höheren Anteil an dem neutralen Polysaccharid Laminarin besitzen (Black, 1952). Der Anteil des Fucoidans in Algen variiert zudem saisonal und besitzt einen höheren Anteil bei Algen, die stärker vom Einfluss der Gezeiten betroffen sind. Daher wird angenommen, dass Fucoidan die Algen vor Sonneneinstrahlung und Austrocknung schützt (Black, 1954; Evans *et al.*, 1973).

Bereits 1913 ging Kylin davon aus, dass Fucoidan Teil der Zellwand der Alge ist, was grundsätzlich von weiteren Untersuchungen bestätigt wurde (Kylin, 1915). So beschreiben Callow *et al.* (1978) eine äußere amorphe Schicht aus sulfatiertem Fucoidan und Alginat, eine äußere fibriläre Schicht aus Alginat und Cellulose und zuletzt eine innere fibriläre Lage aus Fucoidan. Diese Teile der Zellwand bilden sich bereits wenige Stunden nach der Befruchtung der Algeneier (Callow *et al.*, 1978). Durch Autoradiographie konnte der Golgi-Apparat als Ort der Sulfatierung der Polysaccharide ausgemacht werden, die anschließend in der Zellwand eingebaut werden. Jedoch konnte nicht nachgewiesen werden, wo die Synthese des Zuckerrückgrades erfolgt (Brawley und Quatrano, 1979). Anzunehmen ist jedoch, dass auch die Monomerenverknüpfung im Golgi-Apparat stattfindet, da dies in Übereinstimmung mit anderen pflanzlichen Polysacchariden erfolgen würde (Callow *et al.*, 1978).

Die Funktion des Fucoidans in der Zellwand ist nicht genau erforscht. Michel *et al.* gehen davon aus, dass Fucoidan der Verbindung und Stabilität des Alginatnetzwerkes und weiteren Polysacchariden dient (Michel *et al.*, 2010). Dabei kann es als Verbindung zwischen Alginat und Cellulose fungieren (Mabeau und Kloareg, 1987). Der mögliche Aufbau dieser Schichten wird in Abbildung 1.5 gezeigt. In neueren Untersuchungen konnten mit Fucoidanspezifischen Antikörpern (gegen *L. japonica*) Blattsschnitte angefärbt werden. Dort wurde ebenfalls sehr spezifisch die Zellwand gefärbt, genauer 50 – 150  $\mu$ m von der Blattoberfläche, was die Annahme bestätigt, dass Fucoidan größtenteils in der Zellwand vorkommt. (Mizuno *et al.*, 2009).

Die für die Synthese des Fucoidans verantwortlichen Enzyme der Braunalgen konnten bis jetzt nicht identifiziert werden; jedoch wurde eine UDP-Galactose:L-Fucose- $\beta$ -Galactosyl-

Transferase gefunden, die D-Galactose von UDP-Galactose sowohl an L-Fucose als auch Fucoidan transferiert (McCandless und Craigie, 1979).



**Abbildung 1.5: Darstellung der Zellwand von Braunalgen (Michel *et al.*, 2010).**

Über genetische Informationen von Braunalgen ist wenig bekannt. In 2004 wurde *Ectocarpus siliculosus* (Ordnung: Ectocarpales; Familie: *Ectocarpaceae*) als Modellorganismus für Braunalgen vorgeschlagen und das vollständige Genom 2010 (214 Mbp) publiziert (Cock *et al.*, 2010; Peters *et al.*, 2004). Daraufhin postulierten Michel *et al.* (2010) einen Syntheseweg für die Produktion von Fucoidan, basierend auf der Annotation des Genoms. Hiernach wird zuerst Fucose über Fucose-1-Phosphat (mittels GDP-4-keto-6-deoxygalactose) zu GDP-Fucose konvertiert, woraus dann „sulfatierte Fucane“ (Fucoidan) und später eventuell durch eine Kohlenstoff-sulfotransferase die Sulfatierung resultiert. Es steht jedoch der experimentelle Nachweis aus. Ebenso ist offen, ob sich solch ein Syntheseweg auch in den anderen Braunalgenarten befindet.

### 1.3.2 Fucane aus marinen Invertebraten

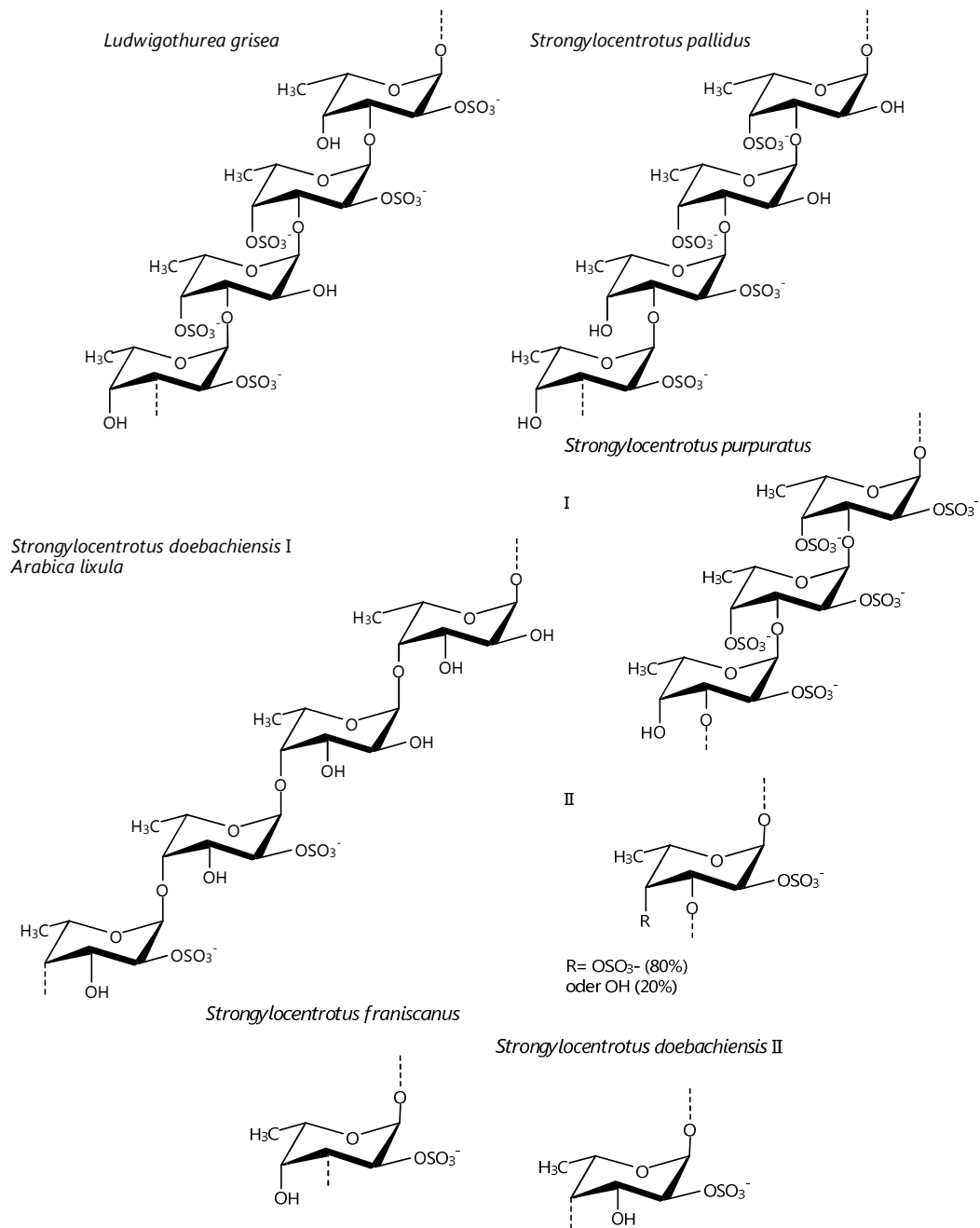
Die erste Beschreibung von Fucanen erfolgte 1948 (Berteau und Mulloy, 2003). In Tabelle 1.2 werden die Arten aufgelistet, von denen bereits Fucane isoliert wurden.

**Tabelle 1.2: Auflistung der Arten mit beschriebenen Fucanen aus tierischen Meeresbewohnern**

<b>Art</b>	<b>Organismus</b>	<b>Referenz</b>
<i>Ludwigothurea grisea</i>	Seegurke	Ribeiro <i>et al.</i> (1994)
<i>Holothuria atra</i>	Seegurke	Chang <i>et al.</i> (2010)
<i>Apostichopus japonica</i>	Seegurke	Chang <i>et al.</i> (2010)
<i>Bohadschia marmorata</i>	Seegurke	Chang <i>et al.</i> (2010)
<i>Echinometra lucunter</i>	Seeigel	Alves <i>et al.</i> (1997)
<i>Arbacia lixula</i>	Seeigel	Alves <i>et al.</i> (1997)
<i>Lytechinus variegatus</i>	Seeigel	Alves <i>et al.</i> (1997)
<i>Acaudina molpadioides</i>	Seegurke	Chang <i>et al.</i> (2010)
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> , <i>S. franciscanus</i> , <i>S. doebachiensis</i> , <i>S. pallidus</i>	Seeigel	Alves <i>et al.</i> (1998), Vilela-Silva <i>et al.</i> (1999), Vilela-Silva <i>et al.</i> (2002)

Die Polysaccharide werden in der gallertartigen Hülle der Eier oder, wie bei Braunalgen, in der Zellwand der Tiere gefunden. Die Fucane scheinen bei den Tieren bei der Fertilisation der Eier eine wichtige Rolle zu spielen und Schutz vor der Fertilisation von artfremden Spermien zu bieten (Vilela-Silva *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass es nicht zur Befruchtung von artfremden Eiern kommt und dies an der artspezifischen Struktur der Fucane liegen kann (Alves *et al.*, 1997).

Die untersuchten Strukturen sind dabei sehr regelmäßig und bestehen zumeist aus  $\alpha$ -1,3 bzw.  $\alpha$ -1,4 verknüpfter L-Fucose. Dabei unterscheiden sich die Arten zumeist in Position der Sulfatierung und der Länge der sich wiederholenden Sequenzen bzw. ist es auch möglich, dass mehrere Strukturen von einer Art gebildet werden (Pomin und Mourão, 2008). In Abbildung 1.6 sind verschiedene Fucanstrukturen von Mollusken und Invertebraten gezeigt. Dabei ist zu beachten, dass die gezeigte Fucanstruktur von *Strongylocentrotus doebachiensis* und *Arbacia lixula* übereinstimmt, jedoch beide Arten in getrennten geographischen Habitaten leben und dadurch die artenunspezifische Befruchtung ausgeschlossen ist (Pomin und Mourão, 2008).



**Abbildung 1.6: Strukturen von Fucanen aus marinen Invertebraten (Pomin und Mourão, 2008).**

Das Molekulargewicht von Fucanen in Seegurken liegt bei über 1 Million Da und ist somit ebenfalls sehr groß (Pomin und Mourão, 2008).

### 1.3.3 Bioaktivität von Fucoidan und Fucan

In Ländern, deren Bevölkerung bereits traditionell viele Algen essen, ist die Häufigkeit einiger Krebsarten, insbesondere von Brustkrebs, reduziert. Zusätzlich haben die Menschen eine längere Lebenserwartung und sind seltener übergewichtig, was teilweise auf den Konsum von algenhaltiger Nahrung zurückgeführt wird (Fitton, 2003; Yamori *et al.*, 2001). Darüber

hinaus werden seit Jahrhunderten Algen oder Algenextrakte in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) eingesetzt, um unter anderem als fiebersenkendes Mittel zu dienen bzw. bei Husten, Bronchitis, Mandelentzündung, Arthritis, sowie bei Magenproblemen, Harninfektionen und Inkontinenz eine Linderung herbeizuführen (Chengkui *et al.*, 1984). Fucoidan aus *Cladosiphon okamurans* oder *Laminaria japonica* zeigten zudem keine toxikologischen Effekt auf Ratten (Gideon und Rengasamy, 2008; Li *et al.*, 2005).

Seit einigen Jahrzehnten werden die vielfältigen biologischen Aktivitäten von Fucoidanen und Fucanen untersucht. So konnte bereits Holtkamp (2009) diverse Bioaktivitäten für natives Fucoidan von *Fucus vesiculosus*, das auch in dieser Arbeit verwendet wurde, nachweisen. In weiteren Publikationen wurden antivirale (Baba *et al.*, 1988; Beress *et al.*, 1993; Hidari *et al.*, 2008), antitumorale (Bui *et al.*, 2005), blutgerinnungshemmende (Pereira *et al.*, 1999), antithrombotische (Boisson-Vidal *et al.*, 2000) und antioxidative Eigenschaften (Ajisaka *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010) für diverse Fucoidane/Fucane beschrieben. Zudem hat Fucoidan von *Lessonia vadosa* die Produktion von Enzymen in Tabakpflanzen aktiviert, die die Produktion von antiviralen, antibakteriellen und antifungalen Sekundärmetaboliten einleiten (Chandía und Matsuhira, 2008). Ebenso wird eine ähnliche Antwort auch durch die Bindung an den Scavenger Rezeptor ausgelöst (Leung *et al.*, 2006). Ein prophylaktischer Effekt durch Infektion von enteralen Prionen (Doh-Ura *et al.*, 2007) oder von *Helicobacter pylori* (Shibata *et al.*, 2003) wurde auch für Fucoidan aus *Cladosiphon okamurans* angegeben.

Zudem wurde ein Schutz vor Gammabestrahlung in Mäusen durch Fucoidan von *Fucus vesiculosus* nachgewiesen (Lee *et al.*, 2008). Die Anwendung von Fucoidan-Chitosan Hydrogelen verbesserte außerdem die Heilung von Brandwunden bei Kaninchen (Sezer *et al.*, 2008).

## 1.4 Hydrolyse von Fucoidan

Fucoidan mit geringerem Molekulargewicht besitzt für bestimmte (medizinische) Bereiche voraussichtlich verbesserte Bioaktivität (Ye *et al.*, 2005). Die Hydrolyse von Polysacchariden wird unterschiedlich verfolgt. Im Allgemeinen gibt es vier verschiedene Methoden, Polysaccharide zu spalten:

- chemisch
- enzymatisch
- mechanisch (Ultraschall)
- Gammabestrahlung

In den nachfolgenden Abschnitten soll sowohl auf die Vor- als auch die Nachteile der ersten beiden genannten Verfahren eingegangen werden, da diese in der Literatur gängige Methoden für die Produktion von Oligosacchariden aus Fucoïdan oder Fucanen darstellen.

### 1.4.1 Chemische Hydrolyse von Fucoïdan

Bei der chemischen Hydrolyse werden Fucoïdane oder Fucane unter Einwirkungen zumeist von anorganischen Säuren gespalten. Auf diese Weise konnten Oligosaccharide (10-20 kDa) unter anderem aus *Lytechinus variegatus* und *Stronglyocentrotus pallidus* erhalten werden, indem die Fucoïdane mit 0,01 M HCl bei 60 °C behandelt wurden (Pomin *et al.*, 2005). Zwar ließen sich hierbei sulfatierte Oligosaccharide nachweisen; aber Sulfatgruppen an der C2-Position wurden meist abgespalten.

Die chemische Hydrolyse von Fucoïdan aus *Undaria pinnatifida* wurde durch Yang *et al.* untersucht. Dabei konnte das Molekulargewicht von ca. 5 100 kDa auf 260 bzw. 30 kDa verringert werden, nachdem ebenfalls mit 0,01 N HCl, durch entweder Kochen für mehrere Minuten (1-10 min) oder durch Erhitzung mithilfe von Mikrowellen, hydrolysiert wurde (Yang *et al.*, 2008).

Da sowohl das Molekulargewicht als auch der Sulfatgehalt für die Bioaktivität von Fucoïdan bzw. Fucan wichtig ist, scheint die chemische Hydrolyse nicht die optimale Methode für die Spaltung zu sein. So konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der antithrombotischen Aktivität und dem Sulfatgehalt von Fucoïdan aus *Ecklonia kurome* gefunden werden (Nishino und Nagumo, 1992; Qiu *et al.*, 2006).

### 1.4.2 Enzymatische Hydrolyse durch Fucoïdanasen/Fucosidasen

Die bereits beschriebene Einschränkung der chemischen Hydrolyse könnte durch enzymatische Hydrolyse umgangen werden. Jedoch sind bisher keine Enzyme bzw. Fucoïdanasen kommerziell erhältlich, die Fucoïdan spalten können.

Es wurden bereits einige Enzyme publiziert, die Fucoïdan hydrolysieren können. Diese Enzyme stammen größtenteils von marinen Lebewesen wie z.B. Algen, Invertebraten (Berteau *et al.*, 2002), Pilzen oder Bakterien (Kusaykin *et al.*, 2008). Dabei gibt es zwei Arten von Enzymen. Zum einen sind es die exo-aktiven und zum anderen die endo-aktiven Hydrolasen, die sowohl intrazellulär als auch extrazellulär bzw. zellassoziiert vorkommen können. Neben den Hydrolasen wurde zudem eine Lyase gefunden, die ebenfalls in der Lage ist Oligosaccharide aus Fucoïdan zu produzieren (Sakai *et al.*, 2003c; Sakai *et al.*, 2003d).

Im Allgemeinen werden häufig keine reinen Enzyme eingesetzt, sondern nur Rohextrakte oder Kulturüberstände. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass mehrere Enzyme an

der Hydrolyse von Fucoidan beteiligt sind. Der Nachweis der Aktivität beruht meist auf der Zunahme reduzierender Zuckerenden (Urvantseva *et al.*, 2006), Abnahme von Viskosität (Furukawa *et al.*, 1992), auf Unterschieden im Elutionsprofil der SEC (Berteau *et al.*, 2002) oder bei Auftrennung in Gelen, z.B. durch Carbohydrate-PAGE (C-PAGE) (Descamps *et al.*, 2006).

Die Fucoidanase-Aktivität beschränkt sich auf Fucoidan oder Fucan von einzelnen Quellen, was möglicherweise von der räumlichen Struktur des Polysaccharids abhängt. Die Fähigkeit, ein fucoidanspaltendes Enzym produzieren zu können, ist zudem nicht artspezifisch, sondern hängt von der Zugehörigkeit einzelner Stämme ab. So konnten Bakunina *et al.* zeigen, dass der Typstamm von *Pseudoalteromonas citrea* ATCC 29719 keine Fucoidanase besitzt, aber weitere Stämme (KMM 3297, KMM 3296, KMM 3298) dieser Art in der Lage waren Fucoidan zu hydrolysieren (Bakunina *et al.*, 2002). Dieses Phänomen könnte durch unterschiedliche Habitate der Stämme und deren Adaption daran hervorgerufen worden sein. Bei Untersuchungen zum Abbau von Fucoidan in japanischen Küstengebieten hinsichtlich von Fucoidanaseaktivität konnten keine Stämme gefunden werden, die aus terrestrischen Proben isoliert wurden (Kusaykin *et al.*, 2008; Morinaga *et al.*, 1981).

Von den bekannten Bakterien sind die meisten Fucoidanaseproduzenten in den Familien der *Vibrio* (Furukawa *et al.*, 1992), *Flavobacteriaceae* (Descamps *et al.*, 2006) oder *Alteromonadaceae* (Sakai *et al.*, 2004; Yaphe und Morgan, 1959) zu finden. In Tabelle 1.3 ist eine Übersicht der derzeit in der Literatur aufgeführten Enzymquellen gezeigt.

**Tabelle 1.3: Übersicht Fucoidanaseproduzierender Mikroorganismen**, erweitert nach Holtkamp *et al.* (2009) und Kusaykin *et al.* (2008)

Organismus	Bezeichnung	Quelle Fucoidan	Literatur
<b>Bacteria</b>			
<i>Vibrio</i> sp.	N-5		Furukawa <i>et al.</i> (1992)
„ <i>Fucanobacter lyticus</i> “	SN-1009	<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	Sakai <i>et al.</i> (2004)
„ <i>Fucobacter marina</i> “	SA-0082	<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	Sakai <i>et al.</i> (2002)
„ <i>Fucophilus fucoidanolyticus</i> “	SI-1234	<i>Cladoisphon okamurans</i>	Sakai <i>et al.</i> (2003a)
<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i>	KMM 3549	<i>Fucus evanescens</i>	Alexeeva <i>et al.</i> (2002)
<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	KMM 3296 KMM 3297 KMM 3298	<i>Fucus evanescens</i> und <i>Laminaria cichorioides</i>	Bakunina <i>et al.</i> (2002)
<i>Flavobacteriaceae</i>	F31	<i>Cladosiphon okamurans</i>	Ohshiro <i>et al.</i> (2010)
<i>Flavobacteriaceae</i>	CZ1127	<i>Acaudina molpadioides</i>	Chang <i>et al.</i> (2010)
<i>Mariniflexile fucanivorans</i>	SW5	<i>Pelvetia canaliculata</i>	Descamps <i>et al.</i> (2006)
<i>Mesonina algae</i>	KMM 3909	<i>Fucus evanescens</i> und <i>Laminaria cichorioides</i>	Urvantseva <i>et al.</i> (2006)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	PF-1	<i>Undaria pinnatifida</i>	Kim <i>et al.</i> (2008)
<b>Mollusken</b>			
<i>Pecten maximus</i>		<i>Ascophyllum nodosum</i>	Berteau <i>et al.</i> (2002)
<i>Patinopecten yessoensis</i>		<i>Nemacystus decipiens</i>	Kitamura <i>et al.</i> (1992)
<i>Littorina kurila</i>		<i>Fucus evanescens</i> <i>Laminaria cichorioides</i>	Kusaikin <i>et al.</i> (2004)

Die allgemeine Einteilung von Glucosidasen in endo- und exoaktive Enzyme findet auch bei Fucoidanasen Anwendung. Daher sollen im Nachfolgenden die bekannten Organismen abhängig von der Art der Spaltung des Fucoidans eingeteilt werden.

### Exo-Aktivität

Bei der Exo-Aktivität von Enzymen beschränken sich im Fall von Fucoidan die gebildeten Produkte entweder auf Fucose oder sulfatierte Fucose; denn bei diesem Mechanismus werden die Zuckereinheiten vom Ende der Kette abgespalten.

Die ersten isolierten Bakterien mit der Fähigkeit, die Konzentration von reduzierenden Zuckern aus Fucoidan (*Fucus vesiculosus*) zu erhöhen, waren „*Pseudomonas atlantica*“ und „*Pseudomonas carrageenovora*“, die mittlerweile der Gattung *Pseudoalteromonas* zugeordnet wurden. Beide Stämme wurden in der Nähe von Halifax, Nova Scotia, gefunden. Die Isolationen standen nicht direkt im Zusammenhang mit der Untersuchung des Abbaus von Fucoidan. Über die Erhöhung der Konzentration von reduzierenden Zuckerenden aus Fucoidan (*Fucus vesiculosus*) berichteten Yaphe und Morgan (1959).

Das Bakterium *Vibrio* sp. N-5 wurde aus Seesand von der Nordküste der japanischen Insel Kyushu isoliert. Drei verschiedene Enzyme wurden aufgereinigt, die sulfatierte Fucose aus



Fuoidan, das aus verschiedenen Algen stammte, produzieren konnten (Furukawa *et al.*, 1992).

Es konnte auch eine  $\alpha$ -Fucosidase aus dem Weichtier *Pecten maximus* isoliert werden, dass Fuoidan aus *Ascophyllum nodosum* hydrolisiert (Berteau *et al.*, 2002; Daniel *et al.*, 1999).

Die beiden Bakterien *Mesonia algae* und *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM 3549 produzieren durch Xylose induzierbare Fuoidanase, die die Konzentration von reduzierenden Zuckerenden erhöht (Alexeeva *et al.*, 2002; Urvantseva *et al.*, 2006).

### Endo-Aktivität

Im Gegensatz zu der Exo-Aktivität werden bei der Endo-Aktivität von den entsprechenden Enzymen Oligosaccharide hergestellt. Der Mechanismus basiert dabei auf der zufälligen Spaltung von Fuoidan innerhalb des Moleküls oder auf der Erkennung bestimmter Strukturen, die zur Bildung von Mehrfachzuckern führen.

Der zu den *Alteromonadaceae* gehörige Stamm ‚*Fucanobacter lyticus*‘ SN-1009 produziert ein extrazelluläres Enzym, dass Fuoidan von *Kjemanella crassifolia* endo-aktiv spalten kann. Weitere Fuoidane, die dieser Stamm spalten konnte, stammten aus *Laminaria japonica*, *Lessonia nigrescens* und *Ecklonia maxima* (alle der Ordnung Laminariales zugehörig). Fuoidan aus *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, *Nemacystis decipiens* und *Cladosiphon okamurans* konnten nicht verwertet werden (Sakai *et al.*, 2004).

Der einzig bekannte Stamm der Familie *Sphingomonadaceae*, *Sphingomonas paucimobilis* PF-1, der Fuoidan (aus *Undaria pinnatifida*) spalten kann, bildet Oligosaccharide mit molaren Massen zwischen 300 – und 3800 Da. Dies entspricht Oligosacchariden aus 2 bis 20 Zuckereinheiten. Die Enzymaktivität konnte zellassoziiert nachgewiesen werden, was eventuell auf ein Membranprotein mit katalytischem Zentrum außerhalb der Zelle hinweisen würde (Kim *et al.*, 2008).

Das Bakterium ‚*Fucobacter marina*‘ SA-0082, das der Familie der *Flavobacteriaceae* angehört, wurde aus Proben vor der Küste von Aomori, Japan, isoliert. Sakai *et al.* konnten aus dem Kulturüberstand eine Fucoglucuronomannan-Lyase aufreinigen, die monosulfatierte, disulfatierte und trisulfatierte Trisaccharide aus sulfatiertem Fucoglucuronomannan (SFGM) produzierte (Sakai *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2003c; Sakai *et al.*, 2003d).

2010 wurden unabhängig voneinander zwei Stämme, die auch zu der Familie der *Flavobacteriaceae* gehören, isoliert, die ebenfalls Oligosaccharide aus Fuoidan (Stamm F-31) oder Fucan (Stamm CZ1127) herstellen (Chang *et al.*, 2010; Ohshiro *et al.*, 2010).

Ein Enzym aus *Littorina kurila* konnte genutzt werden, um spezifisch  $\alpha$ -1,3-glykosidische Bindungen aus Fucoidan von *Fucus evanescens* in Oligosaccharide von 3-10 kDa zu spalten (Kusaikin *et al.*, 2004).

### 1.4.3 *Mariniflexile fucanivorans* SW 5

Descamps *et al.* gelang es 2006, das extrazellulär produzierte Enzym ‚sulfated fucan endo-1,4 fucanase‘ (FcnA) von *Mariniflexile fucanivorans* SW5 zu charakterisieren, das ein Tetrasaccharid und ein Hexasaccharid vom Fucoidan aus der Alge *Pelvetia canaliculata* abtrennte. Das Tetrasaccharid besteht aus jeweils zwei  $\alpha$ -1,3-L-Fucopyranose-2-sulfat- und  $\alpha$ -1,4-L-Fucopyranose-2,3-sulfat-Einheiten. Das Hexasaccharid besteht aus der gleichen homologen Abfolge. Der Stamm wurde aus der Abwasseranlage einer Alginatfabrik in Frankreich isoliert. (Barbeyron *et al.*, 2008; Descamps *et al.*, 2006)

Im selben Jahr wurde das Protein FcnA von Colin *et al.* (2006) aufgereinigt und sequenziert. Teile des N-terminalen Endes zeigten eine Sequenzidentität von 26 % zu dem patentierten Enzym Fda2 des Bakteriums *Alteromonas* sp. SN-1009. Anschließend konnte es rekombinant in *Escherichia coli* kloniert und exprimiert werden (Colin *et al.*, 2006). In der Datenbank für Kohlenhydrat-aktive Enzyme CAZy ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)) erfolgt die Einteilung der bereits bekannten Sequenzen in die Familie GH 107 (Cantarel *et al.*, 2009).

## 1.5 Molmassenbestimmung mithilfe von Gelpermeationschromatographie

Bei der Gelpermeationschromatographie (GPC) oder auch Größenausschlusschromatographie (‚size exclusion chromatography‘ SEC) genannt, werden Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Auftrennungsprinzip beruht auf der Diffusion der Substanzen in die poröse Matrix. Moleküle mit höherem Molekulargewicht eluieren schneller als Moleküle mit kleinerem Molekulargewicht.

Da das Fucoidan als Naturstoff extrahiert wird und dadurch eine große Molmassenverteilung besitzt, stellt die Gelpermeationschromatographie für die Charakterisierung und die Bestimmung des Molekulargewichts der sulfatierten Polysaccharide und deren Oligosaccharide eine geeignete Methode dar.

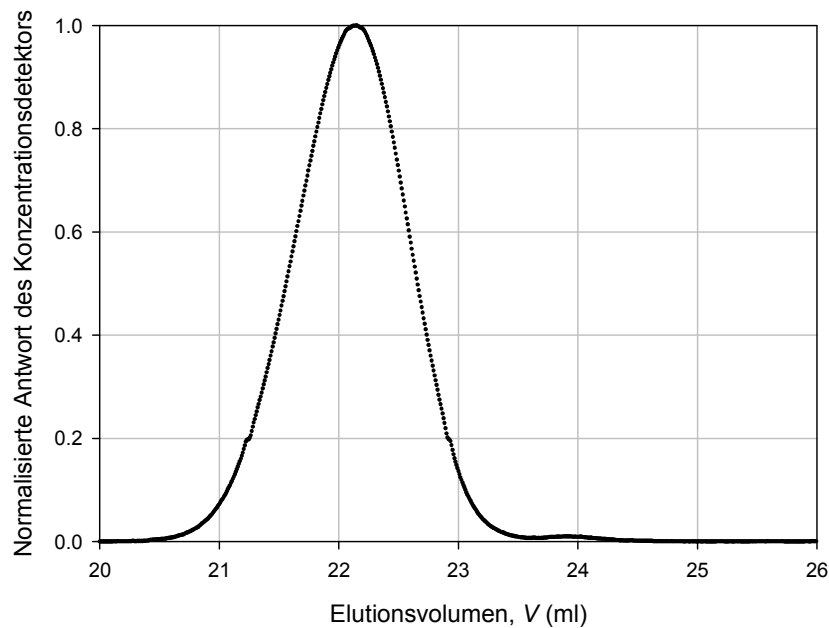
Durch Kalibrierung mit Stoffen, die ähnliche physikalische Eigenschaften besitzen, wie die gemessene Substanz und deren Molekulargewicht bekannt sind, kann das Molekulargewicht bestimmt werden. Wird die Auftrennung mit geeigneten Detektoren gekoppelt, ist es zudem möglich eine online-Messung des Molekulargewichts durchzuführen. Dafür gibt es vier verschiedene Methoden: Lichtstreuung, Osmometrie, Ultrazentrifugation und Viskosimetrie.

In den nachfolgenden Abschnitten soll auf die Standardkalibrierung mit einem konzentrationsselektiven Detektor (RI-Detektor) und die Universalkalibrierung mit einem Viskositätsdetektor genauer eingegangen werden. (Kostanski *et al.*, 2004)

### **1.5.1 Standardkalibrierung**

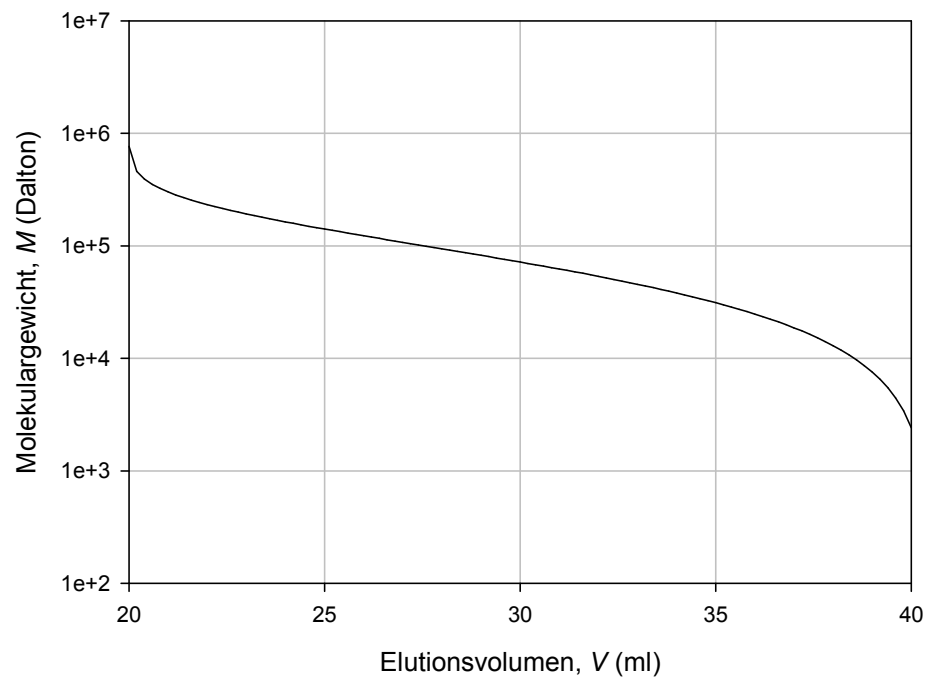
Die Auftrennung in der Gelpermeationschromatographie beruht auf der unterschiedlichen Verweilzeit von Substanzen, die sich nach der Molekulargröße auftrennen lassen. Hierzu diffundieren kleinere Moleküle häufiger in die porösen Trägermaterialien, die auf synthetischen Polymeren oder Dextranen beruhen. Daher ist ein Parameter, der die Molekülgröße beschreiben kann die Zeit, die eine Substanz mit definierter Größe in dem System verbleibt. Für den Vergleich zwischen unterschiedlichen Systemen wird das Elutionsvolumen  $V_e$  verwendet. Als Trenngröße wird das hydrodynamische Volumen  $V_h$  angegeben, das von den physikalischen Eigenschaften des Stoffes abhängig ist. Zusätzlich wird der gyrische Durchmesser  $r_g$  als Stoffgröße, der die Auftrennung beeinflusst, diskutiert (Sun *et al.*, 2004). Die Detektion erfolgt mit konzentrationsselektiven Detektoren. Als solche können RI-, UV- oder FTIR-Detektoren verwendet werden. (Kostanski *et al.*, 2004)

Die Standardkalibrierung beruht auf der Messung des Elutionsvolumen von engverteilten Standards mit bekanntem Molekulargewicht. Die Approximation erfolgt dabei mit ungeraden Polynomen, d.h. linear oder Polynom 3. Ordnung, 5. Ordnung etc. In Abbildung 1.7 ist eine typische Messung mit einem Konzentrationsselektiven-Detektor zu sehen. Aufgetragen ist das Detektorsignal (in diesem Fall RI-Detektor) über dem Elutionsvolumen ( $V$ ).



**Abbildung 1.7: Typisches Elugramm einer GPC; Antwort eines Konzentrationsmessenden Detektor über dem Elutionsvolumen der Probe (engverteilter Pullulanstandard  $M_w$ :13200 Da)**

Durch die Bestimmung des Elutionsvolumens von zahlreichen engverteilten Standards kann eine Kalibrierkurve erstellt werden (Beispiel: Abbildung 1.8). Die Abbildung zeigt eine Auftragung des Molekulargewichts  $M$  über dem Elutionsvolumen  $V$ . Häufig liegt ein großer Bereich des Molekulargewichts in einem linearen Bereich der Kurve.  $V_0$  ist dabei das void volume,  $V_p$  beschreibt das Porenvolumen,  $k$  ist eine Konstante, die sich auf die Beziehung des Gyrationsradius bezieht, der proportional zum Molekulargewicht ist und  $M$  dem Molekulargewicht.



**Abbildung 1.8: Semilogarithmische Auftragung des Elutionsvolumen V über dem Molekulargewicht M** nach der Formel  $V = V_0 + V_P \exp(-kM)$ , wenn  $V_0 = V_P = 20$  ml und  $k = 10^{-5}$  (nach Kostanski *et al.*, 2004)

Aus den Daten der Messungen lassen sich unterschiedliche Molekulargewichtsangaben treffen. Das Zahlenmittel ( $x_n$ ), das Gewichtsmittel ( $x_w$ ) und das Z-Mittel ( $x_z$ ) des Molekulargewichts ( $M_z$ ) sind in den folgenden Formeln dargestellt (Fishman *et al.*, 1991).

$$x_n = \frac{1}{\sum \frac{x_i}{w_i}} \quad (1)$$

$$x_w = \sum w_i X_i \quad (2)$$

$$x_z = \frac{\sum w_i X_i^2}{\sum w_i X_i} \quad (3)$$

Dabei entspricht  $i = 1$  bis  $n$ ;  $H_i$  steht für die Höhe des Detektorsignals, gemessen ab der Basislinie für das Retentionsvolumen  $V_i$ .  $M_i$  ist das Molekulargewicht beim Retentionsvolumen  $V_i$  (Kostanski *et al.*, 2004).

Die Standardkalibrierung enthält eine Limitierung, da für die Kalibrierung Standards verwendet werden müssen, die chemisch gleiche oder ähnliche Eigenschaften besitzen. Nur Stoffe mit gleichen Eigenschaften können für die Kalibrierung herangezogen werden, da ansonsten keine verlässlichen Messungen zu machen sind.

Sobald sich die physikalischen Eigenschaften des zu untersuchenden Stoffes von dem als Standard verwendeten Stoff unterscheiden, kann das hydrodynamische Volumen bei gleichem Molekulargewicht unterschiedlich sein. Dies kann bereits zu einer ungenauen Bestimmung des Molekulargewichts durch die Standardkalibration führen.

### 1.5.2 Universelle Kalibrierung

Der Nachteil der Standardkalibrierung, die dazu führt, dass nur Standards mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften verwendet werden können, kann durch die Erweiterung der Messung mit einem molekulargewichtssensitiven Detektor behoben werden, wie z.B. durch einen Viskositätsdetektor. Um eine Kalibrierung durchzuführen, die nicht auf dem hydrodynamischen Volumen der Substanz beruht, sondern nur das Molekulargewicht berücksichtigt, wird die universelle Kalibrierung durchgeführt. Dazu müssen vorher einige theoretische Annahmen betrachtet werden.

Bei gleichem Elutionsvolumen ergibt sich für zwei Stoffe (gekennzeichnet durch Indices 1 und 2) folgende Relation (Ouano, 1973):

$$[\eta]_1 M_1 = [\eta]_2 M_2 \quad (4)$$

Diese Beziehung kann durch die Mark-Houwink-Gleichung, die sich mit der intrinsischen Viskosität von Stoffen befasst umschrieben werden (Ouano, 1973)

$$[\eta] = K M^\alpha \quad (5)$$

Bei der Kombination der letzten beiden Gleichungen kann folgende Annahme getroffen werden:

$$K_1 M_1^{(1+\alpha)} = K_2 M_2^{(1+\alpha)} \quad (6)$$

Sind das Molekulargewicht (M), das Elutionsvolumen ( $V_e$ ) und die intrinsische Viskosität ( $[\eta]$ ) eines der beiden Stoffe bekannt, bzw. werden durch eine Messung bestimmt, kann das Molekulargewicht des zweiten Stoffes durch Messung des Elutionsvolumen und Messung der Viskosität direkt berechnet werden.

$$\log M_2 = \left[ \frac{1}{(1+\alpha_2)} \right] \log \left( \frac{K_1}{K_2} \right) + \left[ 1 + \frac{(1+\alpha_1)}{(1+\alpha_2)} \right] \log M_1 \quad (7)$$

Die Messung der intrinsischen Viskosität erfolgt dabei bei den komplex aufgebauten Detektoren über 2 oder 4 Kapillaren, die ähnlich einer Wheatstonebrücke angelegt sind. Der Flüssigkeitsstrom wird dabei aufgespalten und auf der einen Seite der Messeinrichtung stark verdünnt. Die entstehende Druckdifferenz wird gemessen, womit die intrinsische Viskosität berechnet wird. (Churms, 1996; Kostanski *et al.*, 2004)

Wenn die Werte der Mark-Houwink-Beziehung nicht bekannt sind, kann eine universelle Kalibrierung mit bekannten Standards durchgeführt werden und so das Elutionsvolumen und die intrinsische Viskosität bestimmt werden, da die Druckdifferenz direkt proportional zu der Viskosität der Flüssigkeit ist (Ouano, 1972).

Durch die Berechnung der intrinsischen Viskosität ist es essentiell, den genauen Wert der injizierten Masse zu kennen. Weiterhin müssen für die Auswertung zwei Detektoren

verwendet werden, ein konzentrationsselektiver Detektor und der Viskositätsdetektor. Die Bestimmung des Versatzes zwischen den beiden Detektoren ist nicht trivial, so dass bei Fehlern in der Bestimmung systemische Fehler große Auswirkungen haben können.

Überdies können nur Substanzen mit einer messbaren intrinsischen Viskosität untersucht werden. Empirische Studien zeigten, dass Molekulargewichte unterhalb von 20 kDa nicht mehr durch die Mark-Houwink-Beziehung beschrieben werden können (Chance *et al.*, 1995).

## 1.6 Ziel der Arbeit

Aufgrund des hohen Potenzials von Fucoidan für die Anwendung im pharmazeutisch/medizinischen Gebiet sollte ein Enzym gefunden werden, das in der Lage ist, Fucoidan der Braunalge *Fucus vesiculosus* zu spalten.

Da momentan kein Enzym kommerziell erhältlich ist, das Fucoidan spalten kann, wurden zwei Ansätze für die Produktion von Fucooligosacchariden ausgewählt. Einerseits sollte die Fucoidanase aus *Mariniflexile fucanivorans* mittels rekombinanter Expression in *E. coli* produziert werden. Andererseits sollten aus Umweltproben Mikroorganismen isoliert werden, die Fucoidanase-Aktivität besitzen.

Das Enzym bzw. die Mikroorganismen sollten für die enzymatische Spaltung von Fucoidan aus *Fucus vesiculosus* eingesetzt werden, um sulfatierte Fucooligosaccharide zu produzieren. Für die Charakterisierung des nativen Fucoidans und insbesondere der sulfatierten Oligosaccharide sollte die HPLC-GPC mit Viskositätsmessung dienen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme

**Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme**

Name	Beschreibung
<i>E. coli</i> XL-1Blue MRF <sup>-</sup>	(Stratagene, Heidelberg), K12-Stamm zur
<i>E. coli</i> CXL-1 Blue MRF <sup>-</sup>	Chemisch kompetente XL-1 Blue MRF <sup>-</sup> Zellen zur Vervielfältigung der Plasmide
<i>E. coli</i> BLR(DE3)	(Stratagene, Heidelberg) recA <sup>-</sup> Abkömmling von BL21 zur Expression der Plasmide
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)	K12-Stamm mit Plasmid pRARE, das für in <i>E. coli</i> selten vorkommende tRNAs kodiert
<i>E. coli</i> Origami 2(DE3)pLys	Mutante von BLR(DE3) zusätzlich <i>trxB<sup>-</sup> gor<sup>-</sup></i>
<i>Mariniflexile fucanivorans</i> SW5 (DSM 18792)	Produzent einer extrazellulären endo-Fucoidanase
<i>Flavobacteriaceae</i> MW-C3	Selbstisolat

### 2.2 Plasmide

**Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide**

Name	Beschreibung
pET21a(+)-fcnA (LK3-2)	Expressionsvektor für die prokaryotische Produktion von fcnA ; enthält His-Tag
pET21a(+)-pelB-fcnA	Expressionsvektor für die prokaryotische Produktion von fcnA; enthält His-Tag und Signalpeptid

### 2.3 Enzyme

**Tabelle 2.3: Eingesetzte Enzyme**

Enzym	Lieferant
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim
CIP (calf intestine phosphatase)	NEB, Frankfurt am Main
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt am Main
RedTaq DNA-Polymerase	Sigma, München
Phusion Polymerase	Finnzymes, Schwerte



## 2.4 Antikörper

Tabelle 2.4: Verwendete Antikörper

Name	Beschreibung
Maus $\alpha$ (c)-myc-Tag (9E10)	IgG, AG Dübel, TU Braunschweig
Maus $\alpha$ - penta HIS, 1:5 000	Antikörper gegen His-Tag des Zielproteins
Ziege $\alpha$ -Maus IgG-Fc, HRP-konjugiert	Polyklonale Antikörper, Sigma, München

## 2.5 Oligonukleotide

Tabelle 2.5: eingesetzte Oligonucleotide

Name	Sequenz	Beschreibung
LKfcnA_f	5'-cgc gtc ata tgc aag tac cag atc caa acc-3'	Amplifikation des fcnA Gens (Fucanase) aus <i>M. fucanivorans</i>
LKfcnA_r	5'-gcg cac tcg agt ttc tta atg aat ttt tcg aac-3'	
AFR-NcoI	5'-gat ccc atg gcc caa gta cca gat cca aac c-3'	
AFR-NheI	5'-gat ccg cta gcc aag tac cag atc caa acc-3'	
AFR-XhoI	5'-gtt cga aaa att cat taa gaa act cga gtg cgc -3'	
MHET21_f1	5'-gag cgg ata aca att ccc c-3'	Amplifikation oder Sequenzierung von Genen aus dem Vektor pET21a(+)
MHET21_r1	5'-gca gcc aac tca gct tcc-3'	
LK-fcnA-f1	5'-cct ttg cag atg cat gtc-3'	
LK-fcnA-f2	5'-ttt cga atc cca tgg tac-3'	
LK-fcnA-f3	5'-acg tta cac ctc caa ctg-3'	

## 2.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.6: Eingesetzte Puffer und Lösungen

Name	Beschreibung
TFB1	10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
	30 mM $\text{CH}_3\text{COOK}$
	50 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
	100 mM $\text{RbCl}$
	15 % (v/v) Glycerin pH 5,8 mit $\text{CH}_3\text{COOH}$
TFB 2	10 mM Morpholinopropansulfonsäure
	10 mM $\text{RbCl}$
	75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
	15 % (v/v) Glycerin pH 8,0 mit $\text{KOH}/\text{CH}_3\text{COOH}$
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/mL Ethidiumbromid in $\text{H}_2\text{O}$
Suspendierungslösung für Plasmidpräparationen	50 mM Tris/HCl
	10 mM EDTA
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A
	pH 0,8
Lysispuffer für Plasmidpräparationen	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS
Neutralisierungspuffer für Plasmidpräparationen	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
TAE-Puffer	40 mM Tris
	20 mM $\text{CH}_3\text{COOH}$
	2 mM EDTA
PBS	8,5 g/L NaCl

## Material und Methoden

	1,34 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
	0,35 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
PBST	0,05 % (v/v) Tween20 in PBS
2 % (w/v) MPBST	2 % (w/v) Milchpulver in PBST
Natriumcarbonatpuffer	50 mM $\text{NaHCO}_3$ pH 9,6
TMB Substratlösung für ELISA	Lösung A: 30 mM Kaliumcitrat, 10 % (w/v) Zitronensäure, pH 4,1 Lösung B: 10 mM Tetramethylbenzidin + 10 % (v/v) Aceton + 90 % (v/v) Ethanol + 80 mM $\text{H}_2\text{O}_2$ (30%) 20 Teile A mit 1 Teil B mischen
Acrylamid-Mix	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
Laemmli-Puffer	50 % (v/v) Glycerin 15 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 3,6 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer für SDS-PAGE	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Coomassie-Lösung	0,05% (w/v) Coomassie R-250 25% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Eisessig
Entfärber für Coomassie	10 % (v/v) Essigsäure
Transferpuffer für Western Blot	25 mM Tris 192 mM Glycin
Substratpuffer für Western Blot	100 mM TrisHCl 0,95 mM $\text{MgCl}_2$ pH 9,5
NBT-Lösung	30 mg NBT/ml in 70 % (v/v) DMF
BCIP-Lösung	15 mg BCIP/ml in DMF
Substratlösung für Western Blot	100 $\mu\text{l}$ NBT-Lösung und 100 $\mu\text{l}$ BCIP-Lösung in 10 ml Western Blot-Substratpuffer
Fixierlösung für Silberfärbung	50 ml Stopplösung 0,0185 % (v/v) Formaldehyd
Natriumthiosulfatlösung für Silberfärbung	0,02 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
Silberlösung für Silberfärbung	0,2 % (w/v) $\text{AgNO}_3$ 0,028 % (v/v) Formaldehyd
Entwickler für Silberfärbung	6 % (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,0185 % (v/v) Formaldehyd 0,002% (v/v) Natriumthiosulfatlösung
Stopplösung für Silberfärbung	50 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Eisessig
Lysepuffer (Expression)	20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,5 M NaCl pH 7,4
DNS-Reagenz	1 % (w/v) 3,5-Dinitrosalicylsäure 30 % (w/v) Kalium-Natrium-Tartrat 16 ml NaOH 10 % (w/v) 50 ml $\text{H}_2\text{O}$ (Nach Erhitzen und Lösen der Bestandteile wird auf 100 ml mit $\text{H}_2\text{O}$ aufgefüllt)
Laufpuffer für C-PAGE (20x)	1 M Tris 20 mM EDTA pH 8,7
BSA-Lösung	0,1 % (w/v) BSA Fraktion V 0,32 % (w/v) Kaliumacetat 4,5 % (v/v) Eisessig pH der Lösung auf 3,72-3,78 einstellen

## 2.7 Kit-Systeme

**Tabelle 2.7: Verwendete Kit-Systeme**

Name	Lieferant
Qiagen QIAmg DNA and Blod Kit	Qiagen, Hilden
Nucleo Spin Nucleo Extract III	Macheray-Nagel, Düren
Mini Plasmid	Macheray-Nagel, Düren

## 2.8 Laborgeräte und Zubehör

**Tabelle 2.8: Auflistung der verwendeten Laborgeräte und weiterem Zubehör**

Bezeichnung	Fabrikate
Schüttelinkubatoren	BS 4 B (B. Braun, Melsungen)
	HT (HT Infors AG, Basel)
	Thermo Shaker PST-60H-4 (Lab4you, Berlin)
Spektrophotometer	Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech, Uppsala)
Zentrifugen	5415D/5810R (Eppendorf, Hamburg)
	Biofuge pico (Heraeus, Hanau)
	Sorvall RC5/RC5B Plus (Kendro, Berlin)
Inkubationsschränke	Typ BE 400 (Mettler, Schwabach)
Heizblöcke	Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)
Sterilwerkbänke	LaminAir HLB 2472 (Heraeus, Hanau)
	Herasafe (Kendro, Berlin)
Waagen	1205 MP (Sartorius, Göttingen)
Thermocycler	DNAEngine (BioRad, München)
	PTC-150 Minicycler TM (MJ Research, Waltham, USA)
Geldokumentationsanlage	Gel Jet Imager (Intas, Göttingen)
Elektrophorese-Kammer	MiniProtein III Cell (BioRad, München)
Blot-Apparatur	Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, München)
Sterilfilter-Einheit	0,2 µm/0,45 µm Celluloseacetatfilter (Sartorius AG, Göttingen)
Mikroskope	Diavert (Leica, Solms)
	CK2 (Olympus)
Netzgeräte	EPS 301/601 (GE Healthcare, München)
	PowerPac HC (BioRad, München)
Reinstwasseranlage	Arium 611 (Sartorius, Göttingen)
DNA-Sequenziergerät	ABI Prism 310 Genetic Analyzer P.E. Applied Biosystems (Perkin Elmer, Waltham, USA)
Gefriertrockner	Alpha1-4 LDplus (Martin Christ, Osterode)
Ultrafiltrationseinheit	Vivaflow 200 (Sartorius, Göttingen)
	Vivaspin 6 (Sartorius, Göttingen)
Messermühle	Retsch (Haan, Deutschland)
Bioreaktor	Minifors (Infors, Basel)

## 2.9 Computerprogramme und Datenbanken

**Tabelle 2.9: Auflistung von verwendeten Computerprogrammen**

Name	Beschreibung
Finch TV 1.4.0	Bearbeitung und Auswertung von Elektropherogrammen (Geospiza Inc., Seattle, USA)
Vector NTI 10.1.1	Bearbeitung und Auswertung von Vektoren für Klonierungen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
Clarity	Software für HPLC-GPC (Prag, Tschechien)
WinGPC	Software für HPLC-GPC (Mainz, Deutschland)
FermVis 1.0.1.5	Software für die Abgasanalyse an Bioreaktoren
Iris NT V 5.01	Auswertung der Online-Messung von Kulturparametern am Bioreaktor

## 2.10 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Biochemikalien entsprachen dem analytischen Reinheitsgrad. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), AppliChem (Gatersleben, Deutschland).

## 2.11 Nährmedien und Supplemente

### 2 x TY-Medium

Trypton	1,6 % (w/v)
Hefextrakt	1 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)

Je nach Bedarf wurden dem Medium Zusätze hinzugefügt (Tabelle 2.10).

**Tabelle 2.10: Verwendete Zusätze von 2 x TY-Medium**

Name	Beschreibung
2 x TY-Agar	1,5 % (w/v) Agar in 2 x TY-Medium
2 x TY-GA-Medium	100 mM Glucose, 100 µg/ml Ampicillin in 2 x TY-Medium
2 x TY-AK-Medium	100 µg/mL Ampicillin, 50 µg/mL Kanamycin in 2 x TY-Medium
2 x TY-T-Medium	50 µg/mL Tetracyclin in 2 x TY-Medium
Ampicillin	100 mg/mL Ampicillin
Tetracyclin	5 mg/mL Tetracyclin in Ethanol
Kanamycin	10 mg/mL Kanamycin

### SOC-Medium

Für die Transformation von kompetenten *E. coli*-Stämmen wurde folgendes Medium verwendet:

Trypton	2 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,05 % (w/v)
Magnesiumlösung	20 mM
Glucose	20 mM
	pH 7
Magnesiumlösung	1 M MgCl <sub>2</sub> , 1 M MgSO <sub>4</sub>

### Artificial Seawater (ASW)

Für künstliches Meerwasser (*Artificial Seawater*) wurden zwei Salzlösungen (Tabelle 2.11) getrennt hergestellt. Beide Lösungen wurden getrennt in etwa gleichen Volumenteilen mit dest. H<sub>2</sub>O angesetzt und gelöst. Unter Rühren wurde Salzlösung 2 zu Salzlösung 1 gegeben und auf 1 Liter aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 7,8 eingestellt.

**Tabelle 2.11: Rezept für Artificial Seawater (ASW)**

Salzlösung 1		Salzlösung 2	
Substanz	Konzentration (g/l)	Substanz	Konzentration (g/l)
NaCl	23,926	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	10,831
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,008	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,519
KCl	0,667	SrCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,024
NaHCO <sub>3</sub>	0,196		
KBr	0,098		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,026		
NaF	0,003		
→ in 600 ml lösen		→ in 300 ml lösen	

Da die Bestandteile des künstlichen Meerwassers nicht für mikrobielles Wachstum ausreichen, wurden weitere Lösungen (Tabelle 2.12, Tabelle 2.13 und Tabelle 2.14) angefertigt.

**Tabelle 2.12: Rezept Vitaminlösung**

Substanz	Konzentration (g/l)	Zusatz für 1 Liter Vitaminlösung
Thiamin · HCl	-	0,1 g
Biotin	1,0	1 ml
Vitamin B12	2,0	1 ml

**Tabelle 2.13: Spurenelement-Lösung**

Substanz	Konzentration (g/l)	Zusatz für 1 Liter Spurenelementlösung
Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	-	3,09 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	-	0,073 g
CoSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	-	0,016 g
MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	-	0,54 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,48	1 ml
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,173	1 ml
NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,49	1 ml

**Tabelle 2.14: Rezept EDTA-Lösung**

Substanz	Konzentration (g/l)
Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	2,44 g
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,77

In Tabelle 2.15 sind alle verwendeten Zusätze für ASW aufgeführt, die je nach Bedarf dem zugegeben wurden.

**Tabelle 2.15: Zusätze für ASW**

Substanz	Konzentration (g/l)	Zusatz für 1 l ASW
C-Quelle	20-500	nach Bedarf
NaNO <sub>3</sub>	46,670	1 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	3,094	1 ml
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9 H <sub>2</sub> O	15,0	2 ml
Vitamin-Lösung	-	1 ml
Spurenelementlösung	-	1 ml
Eisen-EDTA-Lösung	-	1 ml

## Medien für Biolog<sup>®</sup> Messungen

**Tabelle 2.16: Rezept für die Medienbestandteile Basic A und Basic B**

Basic A Substanz	Menge (g)	Basic B Substanz	Menge (g)
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,00	NaHCO <sub>3</sub>	0,19
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20		
NH <sub>4</sub> Cl	0,25		
NaCl	20,00		
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	3,00		
KCl	0,50		
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,15		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,026		
→ in 900 ml lösen		→ in 100 ml lösen	

**Nährmedium 514 und 514a (DSMZ)**

Marine Broth 2216 (MB) wurde kommerziell von Difco (BD, Heidelberg) bezogen und laut Herstellerangabe zubereitet. Modifikationen sind wie folgt verwendet worden: Medium 514a in halber Konzentration (MB2-Medium genannt) mit 500 ml ASW (ohne Zusätze) aufgefüllt. MB10-Medium wurde durch Verdünnung 1:10 mit ASW hergestellt.

**Nährmedium Bioreaktorkultivierung**

Glucose	1 g/l
Fucoidan	0,2 g/l
Ammoniumsulfat	0,157 mM

Die Glucose und das Fucoidan wurden in ASW (mit Zusätzen aus Tabelle 2.15) gelöst und getrennt von der Ammoniumsulfatlösung autoklaviert. Die Zusätze für ASW wurden steril der Ammoniumsulfatlösung nach dem Autoklavieren zugesetzt. Diese Lösung wurde aseptisch dem Bioreaktor zugeführt.

**2.12 Extraktion Fucoidan****Vorbehandlung**

Für die Extraktion wurde die Alge *Fucus vesiculosus* (Blasentang) am Südstrand in Wilhelmshaven, Nordsee, von einer Buhne geerntet (Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1:** Blasentang (*Fucus vesiculosus*) wachsend an einer Buhne, Wilhelmshaven

Die Algen wurden anschließend mit kaltem Wasser gewaschen und an der Luft mehrere Tage getrocknet. Um die Restfeuchte zu entfernen, wurden die Algen über Nacht bei 80 °C getrocknet. Weiterhin wurde sie mit einer Mörsermühle bzw. Messermühle zerkleinert. 50 g der gemörserten Algen wurde in 100 ml Ethanol (100 %)/ Formaldehyd (37 %)/ dest. H<sub>2</sub>O im Verhältnis 80:5:15 über Nacht gewaschen, um organische Farbstoffe zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde abgegossen und die Algen wurden mit 250 ml Aceton entfettet. Das entfärbte und entfettete Algenpulver wurde wieder filtriert und das restliche Aceton wurde unter dem Abzug verdampft. Schließlich wurde das Algenpulver über Nacht bei 80 °C getrocknet.

### **Extraktion**

Für die Extraktion des Fucoidans aus den vorbehandelten Algen wurden 25 g des Algenpulvers mit 250 ml 4 % (w/v) CaCl<sub>2</sub>-Lösung für 3 h bei 60 °C unter Rücklauf gerührt oder alternativ für 15 min bei 120 °C autoklaviert. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile (u.a. Zellmaterial und Ca-Alginat) durch Filtration abgetrennt. Die in Lösung gegangenen Polysaccharide wurden durch das 2,5-fache Volumen an Ethanol ausgefällt.

### **Reinigung**

Die Polysaccharide wurden über Nacht bei 4 °C sedimentiert. In einem weiteren Aufarbeitungsschritt wurde die Flüssigphase dekantiert und der Bodensatz, der die Polysaccharide enthält, zusätzlich bei 5.000 rpm, 20°C, max. 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in dest. H<sub>2</sub>O resuspendiert und eine Ultrafiltration mit dem Vivaflow 200 (MWCO: 100 kDa) durchgeführt. Dabei entstanden zwei Fraktionen aus dem Retentat (Fucoidan >100 kDa) und dem Filtrat (Fucoidan <100 kDa). Beide Fraktionen wurden dann separat gegen dest. H<sub>2</sub>O dialysiert (Visking®, Carl Roth, Karlsruhe) und anschließend gefriergetrocknet.

## **2.13 Kulturführung**

### **2.13.1 Stammhaltung in Glycerinkulturen**

Für die Langzeitlagerung von Bakterienstämmen und Einzelklonen wurden 800 µl einer Übernachtskultur mit 200 µl 90 % (v/v) Glycerin gemischt und in ein 2 ml Mikro-Schraubröhrchen überführt. Die Kultur wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.



### 2.13.2 Stammhaltung auf Agarplatten

Zur Stammhaltung wurden die Bakterienstämme unter sterilen Bedingungen auf Agarplatten ausgestrichen und je nach Wachstum 24 bis 72 h bei 25 °C inkubiert. Die Lagerung erfolgte für 4 Wochen bei 4 °C und wurde nach Bedarf erneuert.

### 2.13.3 Vorkultur

Das verwendete Medium für die Vorkultur entsprach dem für die Hauptkultur. Allgemein wurden 20 ml Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben von Agarplatten angeimpft und bei 25 °C und 150 rpm über Nacht kultiviert. Im Falle der Bioreaktorkultivierung wurden von der regulären Vorkultur drei 500 ml Erlenmeyerkolben mit je 50 ml Medium als zweite Vorkultur über Nacht inkubiert und als Inokulum genutzt.

### 2.13.4 Hauptkultur im Schüttelkolben

Für die Hauptkultur wurde 5 % (v/v) einer Vorkultur verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Medien sind in Kapitel 2.10 aufgeführt. Die Kultivierungen wurden entweder mit 20 ml Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben oder mit 50 ml in 500 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. Alle Kultivierungen wurden bei 25 °C und 150 rpm inkubiert; bei Abweichung von den Standardbedingungen ist dies bei den Ergebnissen gekennzeichnet.

### 2.13.5 Kultivierung im Bioreaktormaßstab

Für die Produktion von fucoidanspaltendem Enzym wurde eine Kultivierung in einem 3,5-l Bioreaktor durchgeführt. Der Reaktor wurde mit 2,5 l ASW bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Die Zuckerlösung und die Stickstofflösung wurden separat bei gleichen Bedingungen autoklaviert und vor dem Start der Kultivierung zugefüttert. Alle weiteren Zusätze für ASW (Kapitel 2.11) wurden steril filtriert und vor der Zufütterung zu der Stickstofflösung steril zugegeben.

Die für die Kultivierung verwendeten Parameter sind in Tabelle 2.17 genannt.

**Tabelle 2.17: Parameter für die Bioreaktorkultivierung**

Parameter	Wert
Volumen	3 Liter
pH	7,0 geregelt
Drehzahl	Kaskade 200 bis 800 rpm
pO <sub>2</sub>	min 30 %
Belüftungsrate	0,5 l l <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> (1,5 l/min)
Temperatur	25 °C

Für die Kultivierung wurde die Drehzahl anfangs auf 200 rpm eingestellt und eine Kaskade eingerichtet, die variierend die Drehzahl zwischen 200 und 800 rpm regelte, falls der  $pO_2$  unter 30 % sank. Der pH wurde auf 7,0 eingestellt und mit NaOH (10 % (w/v)) und  $H_2SO_4$  (5 % (w/v)) geregelt. Als Antischaummittel wurde Ucolup (1:10 verdünnt) vor und während der Kultivierung zugefüttert.

Kultivierungsparameter wie pH,  $pO_2$ , Rührerdrehzahl, Pumpenleistung (Säure, Base, Antischaummittel) und Temperatur wurden online aufgezeichnet. Der Gehalt an Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid wurde mithilfe eines Abgasanalysegeräts (BlueSens, Herten) aufgenommen. Die restlichen Werte wurden offline vermessen.

### **2.14 Bestimmung der Kultivierungsparameter**

#### **2.14.1 Bestimmung der $OD_{600}$ von Bakterienkulturen**

Die Messung der optischen Dichte  $OD_{600}$  von Bakterienkulturen erfolgte bei 600 nm in einem Spektrophotometer mit dem entsprechenden Kulturmedium als Referenz.

#### **2.14.2 Test auf reduzierende Enden von Zuckern**

Die reduzierenden Enden von Zuckern wurden durch eine Reaktion mit Dinitrosalicylsäure (DNS) bestimmt (Miller, 1959). Für diese Messung wurden 100  $\mu$ l Probe mit 100  $\mu$ l DNS-Reagenz versetzt und für 7 min bei 95 °C erhitzt. Die Lösung wurde anschließend auf Eis gekühlt und mit 800  $\mu$ l dest.  $H_2O$  verdünnt. Als Standard wurde Fucose (0-2 g/l) verwendet. Die Absorption wurde bei 540 nm in einem Spektrophotometer vermessen.

#### **2.14.3 Trübungstest nach Kitamikado**

Anionische Polysaccharide, darunter auch Fucoidan, können durch eine BSA-Lösung (pH 3,7) ausgefällt werden (Kitamikado *et al.*, 1990).

Hierfür wurden 200  $\mu$ l Probe mit 2 ml der BSA-Lösung in einem Reagenzglas gemischt. In Anwesenheit von Fucoidan (oder eines anderen negativ geladenen Polysaccharids) entsteht augenblicklich eine milchige Trübung der Lösung. Als Vergleich werden Lösungen mit und ohne Fucoidan genau wie Proben behandelt und zum optischen Vergleich herangezogen.

## 2.15 Molekularbiologische Methoden

### 2.15.1 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien

Um genomische DNA zu isolieren wurde das Qiagen Kit QIAmg DNA and Blood Kit verwendet. Dazu wurde eine Einzelkolonie einer Platte von *Mariniflexile fucanivorans* mit einer sterilen Impföse entnommen und in 180 µl Puffer ATL (Firmenbezeichnung) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gelöst. Die Aufreinigung der genomischen DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Eluiert wurde mit 50 µl H<sub>2</sub>O. Derartig präparierte DNA wurde für eine PCR mit Primern für die Fucoidanase FcnA eingesetzt.

### 2.15.2 Präparation von *E. coli* Plasmid-DNA

Um die Plasmid-DNA aus *E.coli*-Stämmen zu isolieren wurde das Nucleo Spin Nucleo Extract III Kit (Macheray-Nagel) verwendet.

Hierzu wurde eine Übernachtskultur der Zellen in 2x TY-GA-Medium bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Durchführung der Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Die DNA wurde anschließend in 50- 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.15.3 Amplifikation von DNA via PCR

Die genomische DNA von *Mariniflexile fucanivorans* wurde durch eine Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) überprüft.

Die isolierte DNA wurde zu dem Reaktionsansatz gegeben und die Reaktion wurde laut Tabelle 2.18 durchgeführt.

**Tabelle 2.18: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Temperaturverlauf der PCR für die Amplifikation der Fucoidanase *fcnA* aus genomischer DNA von *Mariniflexile fucanivorans***

Matrizen DNA	6 µl	<table><tr><td>94 °C</td><td>1 min</td></tr><tr><td>94 °C</td><td>30 sec</td></tr><tr><td>54 °C</td><td>30 sec</td></tr><tr><td>72 °C</td><td>2 min</td></tr><tr><td>72 °C</td><td>10 min</td></tr></table> <div>29 x</div>	94 °C	1 min	94 °C	30 sec	54 °C	30 sec	72 °C	2 min	72 °C	10 min
94 °C	1 min											
94 °C	30 sec											
54 °C	30 sec											
72 °C	2 min											
72 °C	10 min											
5 x HF Puffer	10 µl											
10 pmol Forward Primer	0,5 µl											
10 pmol Reverse Primer	0,5 µl											
dNTPS	1 µl											
Phusion Polymerase	1 µl											
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl											

Nach Beendigung der Reaktion erfolgte eine Auftrennung in einem Agarosegel.

### Kolonie-PCR

Die Überprüfung des Erfolges der Klonierung wurde mittels Kolonie-PCR durchgeführt. In den Reaktionsansatz wurde Zellmaterial von Einzelkolonien resuspendiert (Tabelle 2.19).

**Tabelle 2.19: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Temperaturverlauf der Kolonie-PCR für die Überprüfung der erfolgreichen Klonierung der Fucoidanase *fcaA***

Red Taq 10x PCR Reaktionspuffer	2,5 µl		
10 pmol Forward Primer	0,5 µl	98 °C	2 min
10 pmol Reverse Primer	0,5 µl	94 °C	60 sec
dNTPS	1 µl	56 °C	30 sec
Red Taq DNA Polymerase	1 µl	72 °C	6 min
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl	72 °C	10 min

} 29 x

Die Auftrennung der Amplifikate und die Beurteilung der Klonierung wurde durch eine gelelektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel durchgeführt.

#### 2.15.4 Restriktionsverdau

Für die Herstellung von DNA-Fragmenten definierter Größe wurde Plasmid-DNA enzymatisch mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Enzyme, Puffer und Zugaben zu der DNA wurden nach Herstellerangaben verwendet. Die Restriktion erfolgte 3-6 h bei dem Temperaturoptimum der verwendeten Enzyme. Durch eine Behandlung für 20 min bei 65 °C wurden die Enzyme inaktiviert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz dephosphoryliert. Der Erfolg der Restriktion wurde mittels einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

#### 2.15.5 Dephosphorylierung endständiger 5'-DNA-Phosphatgruppen

Für eine anschließende Ligation wurden die 5'-DNA-Enden enzymatisch mit der CIP (*calf intestine phosphatase*) abgespalten. Hierzu wurde direkt nach der Restriktion der Plasmid-DNA und der Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen 0,5 µl CIP hinzugefügt. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und zusätzliche 0,5 µl CIP wurden hinzupipettiert und wiederum wie oben inkubiert. Das Enzym wurde inaktiviert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend für eine Ligation eingesetzt.

#### 2.15.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente zu ligieren wurde eine Ligation mit T4-DNA-Ligase durchgeführt. Hierfür wurden die DNA-Fragmente, die Ligase und das dazugehörige Puffersystem wie in Tabelle 2.20 zusammenpipettiert und entweder für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die DNA wurde daraufhin direkt für die Transformation von *E. coli* Zellen eingesetzt.

**Tabelle 2.20: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes**

T4 DNA Ligase 10x Puffer	1 µl
T4 DNA Ligase	0,2 µl
Vektor DNA	50 ng
Insert DNA	molares Verhältnis zur Vektor DNA 1:3
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

### 2.15.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in einem 1 % (w/v) Agarosegel bei 110 V und in einem TAE-Puffersystem. Für die Auftragung wurden die DNA-Proben 6:1 in 6 x Laufpuffer verdünnt. Während der Elektrophorese wurde zeitgleich ein Größenstandard mitgeführt. In das Agarosegel wurde Ethidiumbromid gelöst, um die DNA später unter der UV-Lampe sichtbar zu machen.

### 2.15.8 Sequenzierung von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA (Sanger *et al.*, 1977)

Für die Sequenzierung von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA wurde die Ausgangs-DNA mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleosidtriphosphaten amplifiziert. Die dadurch verursachten frühzeitigen Strangabbrüche führten zu einer statistisch gleichmäßigen Verteilung unterschiedlich langer DNA-Fragmente. Der Sequenzier-PCR-Ansatz wurde zur Entfernung von Salzen, Polymerase und Nukleosidtriphosphaten gefällt und in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die gelöste DNA wurde für 2 min bei 94 °C erhitzt und dann in 0,5 ml Sequenziergefäße überführt. Nach Kapillarelektrophorese wurde die Sequenz der Ausgangs-DNA ermittelt.

**Tabelle 2.21: Zusammensetzung und Temperaturverlauf eines Sequenzier-Ansatzes**

DNA (30 ng PCR-Produkt oder 300 ng Plasmid-DNA)			
Big Dye Reagenz (Applied Biosystems)	1 µl	1 min	96 °C
Oligonukleotide (10 pmol/µl)	1 µl	30 s	96 °C
TSR-Puffer (Applied Biosystems)	2 µl	15 s	50 °C
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl	4 min	60 °C

} 24 x

### 2.15.9 Herstellung chemokompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden über Nacht die entsprechenden *E. coli*-Stämme bei 37 °C in 5 ml 2 x TY-Medium mit entsprechenden Zusätzen kultiviert. Dann wurden 100 ml des gleichen Mediums mit einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,05 angeimpft. Die Kultur

wurde inkubiert bei 37 °C und 250 rpm bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht wurde. Die Kultur wurde geteilt und anschließend für 4 min bei 4°C und 3220g (4000 rpm) abzentrifugiert. Die Pellets wurden jeweils in 15 ml eiskaltem TFB1 resuspendiert und auf Eis für 90 min inkubiert. Die Bakterien wurden dann für 5 min bei 4 °C und 3220 g (4000 rpm) abzentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in 2 ml TFB2 resuspendiert und zusammengeführt. Es wurden 200 µl der Bakterienlösung sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

### **2.15.10 Transformation von *E. coli* Zellen mittels Hitzeschock**

Die tiefgefrorenen chemokompetenten Zellen wurden in einem Eisbad aufgetaut und vorsichtig gemischt. Dann wurden 50 µl der Zellen zu 1 µl Plasmid-DNA oder Ligationsansatz gegeben, vorsichtig gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei exakt 42 °C für 60 Sekunden. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis inkubiert. Dann wurden zu dem Ansatz 950 µl SOC-Medium gegeben und für 60 min bei 37 °C im Thermomixer bei 300 rpm inkubiert. Die Ansätze wurden verdünnt auf 2 x TY-GA Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### **2.15.11 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* und Zellaufschluß**

Ziel war es, das Enzym in großer Menge zu produzieren. Dazu wurde im ersten Schritt eine Expressionsanalyse durchgeführt, um den Einfluss von Temperatur, IPTG-Konzentration und Glucosemenge auf die Expression zu bestimmen. Eine Kultur aus 50 ml 2 x TY-GA Medium wurde mit den transformierten BLR(DE3)-Zellen mit einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,05 angeimpft. Diese wurde bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 inkubiert. Danach folgte die Zugabe des IPTG und die Expression bei den Temperaturen 17 °C, 20 °C, 25 °C und 30 °C mit einer Drehzahl von 150 rpm. Es wurden stündlich (bis 8 h) Proben genommen, diese bei 11 000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde von dem Zellpellet getrennt und das Pellet mit BugBuster (Merck) aufgeschlossen. Es wurden sowohl der Kulturüberstand, Zellüberstand und auch die Zelltrümmer (Pellet) mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

Nach Ermittlung der besten Expressionsparameter wurde eine Kultur (200 ml) mit einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,05 angeimpft und bis zu einem Wert von 0,5-0,8 inkubiert. Danach folgte die Zugabe des IPTGs und die Expression bei 150 rpm. Es wurde nach 5 h beendet und der Kulturüberstand bei 4 °C und 4 000 rpm für 10 min abzentrifugiert.

### 2.15.12 Aufreinigung des rekombinanten Proteins mit Ni-Sepharose

Die Aufreinigung des rekombinant produzierten Enzyms erfolgte über Ni-Sepharose. Die beladene Ni-Sepharose wurde dreimal mit 5 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde sie 5 min im Überkopfschüttler inkubiert und 5 min bei 500 g (1 500 rpm) abzentrifugiert. Anschließend wurde das Material in 1 ml Binding Buffer mit 10 mM Imidazol aufgenommen und in einem 15 ml Falcon mit 10 ml Probe (1:1 Kulturüberstand:Binding Buffer mit 20 mM Imidazol) gemischt. Es folgte eine 30 minütige Inkubation auf einer Wippe bei 4 °C. Dann wurde das Material für 5 min bei 500 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen (50 µl wurde für SDS-PAGE aufbewahrt). Dies wurde wiederholt, bis der komplette Kulturüberstand aufgetragen worden war. Es folgte das Waschen mit 4 ml 10 mM Imidazol Binding Buffer und eine Inkubation für 5 min bei 4 °C mit anschließendem Abzentrifugieren. Dies wurde mit 30 mM und 50 mM Imidazol Binding Buffer wiederholt. Es wurde jeweils 50 µl des Überstandes für die Analyse mit einer SDS-PAGE aufbewahrt. Anschließend wurde mit PBS gewaschen. Die entnommenen Proben wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

### 2.15.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde als Trenngel ein 12 % Polyacrylamidgel (PAA-Gel) verwendet, das mit einem 6 % Sammelgel aus Polyacrylamid überschichtet wurde. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 2.22 zu sehen. Die Proben wurden mit 5x Laemmli-Puffer versetzt und aufgetragen. Als Marker wurde BioRad Unstained Marker (Coomassie-Färbung: 3 µl; Silbernitratfärbung: 1 µl) verwendet. Anschließend wurde pro Gel konstante 15 mA eingestellt und die Auftrennung für ca. 50 min durchgeführt.

**Tabelle 2.22 Zusammensetzung für SDS-PAA-Gele**

Substanz	Trenngel (12%)	Sammelgel (4%)
dest. H <sub>2</sub> O	1,3 ml	1,00 ml
30 % Acrylamid mix	1,6 ml	0,26 ml
1,5 M TrisHCl pH 8,8	1,0 ml	0,20 ml
10 % SDS	40 µl	15 µl
10 % APS	40 µl	15 µl
TEMED	2 µl	2 µl

### Coomassie-Färbung

Zur Färbung wurde das Gel mit Färbelösung überschichtet und kurz in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht und anschließend wurde es für 5-10 min auf einer Wippe inkubiert. Zum

Entfärben wurde die Färbelösung entfernt und Reste wurden mit Wasser entfernt. Das Gel wurde dann mit Entfärbelösung übergossen und ebenfalls kurz in der Mikrowelle erhitzt. Dann wurde das Gel für ca. 30 min auf einer Wippe entfärbt.

### **Silbernitratfärbung**

Das PAA-Gel wurde über Nacht in Fixierlösung gelagert. Dann wurde es drei Mal für 20 min mit 50 % (v/v) Ethanol gewaschen und 1 min in Natriumthiosulfatlösung geschwenkt. Diese Lösung wurde dann drei Mal kurz mit dest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde das Gel 20 min. in Silberlösung gefärbt. Das Gel wurde drei Mal mit dest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Für die Entwicklung der Banden wurde das Gel mit Entwickler für 1-10 min entwickelt bis Banden sichtbar werden und dann 2 Mal 2 min. mit dest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Entwicklung wird dann durch die Stopplösung beendet.

### **2.15.14 Westernblot/Immunoblot**

Der Western Blot wurde in einem semi-dry Verfahren erstellt. Dafür wurde ein weiteres SDS-Gel mit 3 µl Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad, München) hergestellt. Das Gel wurde auf zwei Filterpapiere (GB 002, Schleicher & Schüll), die in Laufpuffer getränkt und luftblasenfrei auf die Elektrode gelegt wurden, platziert. Dann wurde eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran auf das Gel positioniert und ebenfalls zwei angefeuchtete Filterpapiere darübergelegt. Die Schichten wurden zusätzlich mit Westernblotpuffer getränkt. Die nachfolgende Elektrophorese lief bei einer maximalen Stromstärke von 0,77 A und einer Spannung von 20 V für 1h.

Die geblottete Membran wurde daraufhin 1 h in 10 ml MPBST geschwenkt. Die Proteine des Milchpulvers sorgten für das Blocken der Membran, damit der Antikörper nicht unspezifisch an freie Bindungsstellen der Membran bindet. Im Anschluss wurde in 10 ml MPBST mit einer Verdünnung von 1:5000 der Antikörper gegen den His-Tag inkubiert. Nach einmaligem kurzen und zweimal 5 min Waschen mit PBST wurde der zweite Antikörper wieder in MPBST mit einer Verdünnung von 1:10000 inkubiert. Dieser enthält eine Alkalische Phosphatase (kovalent gebunden), mit deren Hilfe die Position der Antikörper sichtbar gemacht werden kann.

Nach weiteren einmaligem kurzen und zweimal 5 min Waschen mit PBST wurde die Membran in 10 ml Substratpuffer mit jeweils 100 µl BCIP und NTB gelegt bis die Banden entwickelt waren.



## 2.16 Isolierung mariner Bakterien

Für die Isolierung von Mikroorganismen marinen Ursprungs, die potentiell eine Fucoidanase-Aktivität besitzen, wurden Proben von Algen, Sand und Meerwasser in Wilhelmshaven (Deutschland) am Südstrand (Nordsee), genommen. Für die Isolierung wurden verschiedene Medien (Tabelle 2.23) verwendet, um den unterschiedlichen Nährstoffanforderungen der Mikroorganismen gerecht zu werden.

**Tabelle 2.23: Verschiedene Medien für die Isolierung mariner Mikroorganismen**

Medium	Inhaltsstoffe
MB	Medium 514 + 0,5 g/l Fucoidan
MB2	Medium 514a + 0,5 g/l Fucoidan
MW	Natürliches Meerwasser + 0,5 g/l Fucoidan

Teile der Proben wurden auf den verschiedenen Flüssigmedien (20 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben) für 1 Woche bei 25 °C und 150 rpm inkubiert (insgesamt 9 Ansätze). Anschließend wurden 200 µl des Kulturüberstandes auf dasselbe Medium überimpft und unter gleichen Bedingungen für 1 weitere Woche kultiviert. Im Folgenden wurden die Kulturen mit sterilem PBS verdünnt (Verdünnungsstufen  $10^{-2}$ - $10^{-8}$ ) und auf Agarplatten (Flüssigmedium mit 15 g/l Bacto Agar verfestigt) ausgestrichen, um einzelne Kolonien verschiedener Mikroorganismen zu erhalten.

### 2.16.1 Screening nach fucoidanabbauenden Mikroorganismen

Von den in Kapitel 2.16 angereicherten Bakterienkulturen wurden einzelne Kolonien aus geeigneten Verdünnungsstufen gepickt und in 96-well Mikrotiterplatten (MTP/ PP-Mikroplatten, greiner bio-one, Frickenhausen) mit 200 µl Medium bei 25 °C und 750 rpm kultiviert. Für die nachfolgenden Schritte wurde das Isolierungsmedium der einzelnen Bakterien verwendet. Nach 5-7 Tagen Inkubation wurde mithilfe des Trübungstests (Kapitel 2.14.3) nachgewiesen, ob Fucoidan noch im Überstand vorhanden war. Dazu wurden 20 µl der kultivierten Platten (Masterplatte) in MTPs mit 180 µl frischem Medium (Kopieplatte) transferiert. Die Masterplatte wurde bei 4 °C gelagert. Die Kopieplatte wurde wiederum 5-7 Tage inkubiert. Dann wurden die Zellen der Kopieplatte abzentrifugiert und 100 µl des Überstandes in eine neue MTP transferiert. Zu dem zellfreien Überstand wurden 100 µl der sauren BSA-Lösung gegeben. Falls keine Trübung entstand, wurde angenommen, dass die Mikroorganismen fucoidanverwertende Enzyme produzieren. Diese Bakterien wurden von der Masterplatte ausgewählt und einzeln auf Agarplatten mit dem Isolierungsmedium

ausgestrichen. Falls hiernach keine Reinkultur erreicht wurde, wurden die Kulturen vereinzelt bis Reinkulturen vorhanden waren.

### **2.17 Sequenzierung der 16S rDNA**

Die Sequenzierung der 16S rDNA wurde von der Firma BioSolution Halle (Halle, Deutschland) durchgeführt. Die Sequenz wurde doppelsträngig ermittelt. Für die Auswertung wurde das Ribosomal Database Project Release 10 (<http://rdp.cme.msu.edu/>) verwendet (Cole *et al.*, 2009). Für die Erstellung der phylogenetischen Bäume wurden die Programme MEGA 5 und TreeView genutzt (Tamura *et al.*, 2011).

### **2.18 Biochemische und Phänotypische Charakterisierung von MW-C3**

#### **2.18.1 Phänotypische Charakterisierung mit Biolog® Phenotype MicroArrays<sup>TM</sup>**

Ein wichtiges Merkmal für die Identifizierung und Charakterisierung von Mikroorganismen ist deren Verwendung von Nährstoffen. Für die Auswertung einer Vielzahl an Nährstoffen wurden Phenotype MicroArrays<sup>TM</sup> der Firma Biolog, Inc. genutzt (AES Chemunex, Angelbachtal). Bei diesem System wird die metabolische Aktivität anhand der Reduktion eines Tetrazolium-Farbstoffes anstelle des Wachstums bestimmt (Bochner, 2009).

Bakterien wurden aus dem Glycerinstock auf eine MB2-Agar-Platte ausgestrichen und bei 25 °C inkubiert. Nach 48 h wurden von dieser Platte Kolonien entnommen, auf eine frische MB2-Agar-Platte überimpft und unter gleichen Bedingungen weitere 48 h inkubiert.

Zum Beimpfen wurde der vollständige Bewuchs der Agarplatte mithilfe eines sterilen Wattestäbchens in die Inoculation solution 2 gegeben. 2 ml der Lösung wurden zu den 10 ml Inoculation solution 1 gegeben (Tabelle 2.24). Die fertige Lösung wurde in ein steriles Schälchen überführt und von dort mit einer Multipipette auf die PM-Platte (100 µl pro well) gegeben. Die Inkubationszeiten der PM-Platten im OmniLog-Reader (Biolog, Inc.) betrugen 72 h bei einer Temperatur von 25 °C.

**Tabelle 2.24: Zusammensetzung der Medien für Biolog® PM 1 und PM 2A MicroPlate™ Kohlenstoffverwendung**

Inoculation solution 1		Inoculation solution 2	
DyeD	0,120 ml	IF-0 (1,2x)	5,00 ml
Steriles H <sub>2</sub> O	0,406 ml	Basic A (10x)	0,45 ml
Basic A (10x)	0,900 ml	Basic B (10x)	0,05 ml
Basic B (10x)	0,100 ml	Steriles H <sub>2</sub> O	0,50 ml
Vitamine	0,120 ml		
Spurensalze	0,024 ml		
IF-0 (1,2x)	8,330 ml		

Aus dem Basic Medium A wurden die entsprechenden Salze entfernt, wenn ihre Verwendung durch die Mikroorganismen untersucht wurde. Für die Charakterisierung anhand der PM-Platten PM3A, PM4 und PM5 wurden zusätzlich 100 µl Fucose (2 M) gegeben. Der Farbumschlag des Tetrazolium-Farbstoffes wurde mit dem Omnilog-Reader aufgezeichnet.

## 2.18.2 Anforderung an den Salzgehalt des Mediums

### Natriumchlorid-Gehalt

Als Kultivierungsmedium für das Isolat MW-C3 wurde Basic Medium A ohne Natriumchlorid angesetzt. Zusätzlich wurde eine 10 % (w/v) NaCl-Lösung angesetzt und autoklaviert. Basic Medium A und Basic Medium B wurden mit der NaCl-Lösung so kombiniert, dass in Schritten von 1% eine Konzentrationsspanne von 0-9 % (w/v) NaCl im endgültigen Medium erreicht wurde. Glucose wurde in der Konzentration 5 g/l hinzugefügt. Das Wachstum wurde 14 Tage beobachtet und durch Messung der OD<sub>600</sub> in einem Spektrophotometer in einer Dreifachbestimmung ausgewertet.

### Salzgehalt (% ASW)

Autoklaviertes ASW wurde mit sterilem dest. H<sub>2</sub>O so verdünnt, dass folgende Konzentrationsgehalte erreicht wurden: 0, 10, 30, 50, 70, 90 und 100 %. Glucose wurde dem Medium in der Konzentration von 5 g/L zugefügt. Das Wachstum wurde durch Messung der OD<sub>600</sub> in einem Spektrophotometer in einer Dreifachbestimmung ausgewertet.

## 2.18.3 Bestimmung des pH Optimums

Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes für die Kultivierung wurde ASW mit folgenden Puffern angesetzt: 10 mM MES (pH 5,0/5,5/6,0), 10 mM PIPES (pH 6,5 und 7,0), 10 mM HEPES (pH 7,5), 10mM Tris (pH8,0 und 8,5) und kein Puffer für pH 9,0. Es wurden die Kultivierungen in Dreifachbestimmung ausgeführt und das Wachstum wurde durch Bestimmung der OD<sub>600</sub> ausgewertet.

#### **2.18.4 Bestimmung des Wachstums bei verschiedenen Temperaturen**

Um den Temperaturbereich zu bestimmen, in dem MW-C3 wachsen kann, wurde er auf MB2-Agar-Platten mit 0,5 g/l Fucoidan ausgestrichen und bei folgenden Temperaturen inkubiert: 4, 17, 25, 30, 37 und 40 °C.

#### **2.18.5 API System (BioMérieux)**

##### **API 20 NE**

Die Durchführung des Tests wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Das Inokulum für den Test wurde statt mit physiologischer Kochsalzlösung mit 2 ml ASW angesetzt und auf einen Trübungsstandard McFarland von 0,5 eingestellt. Die Streifen wurden bei 25 °C für 24 h inkubiert. Eine Übersicht der enthaltenen Tests findet sich im Anhang.

##### **API ZYM**

Die Durchführung des Tests wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Das Inokulum für den Test wurde statt mit physiologischer Kochsalzlösung mit 2 ml ASW angesetzt und auf einen Trübungsstandard McFarland von 5-6 eingestellt. Die Streifen wurden bei 25 °C für 4 h inkubiert. Eine Übersicht der enthaltenen Tests findet sich im Anhang.

#### **2.18.6 Katalase Aktivität**

Eine Kolonie einer frisch ausgestrichenen Agarplatte des zu untersuchenden Organismus wurde auf einem Objektträger ausgestrichen. Die Kolonie wurde dann mit 2 % (v/v) Wasserstoffperoxid-Lösung (Sigma-Aldrich) überdeckt. Die Produktion von Gasbläschen wies auf Katalase-Aktivität hin.

#### **2.18.7 Oxidase Aktivität**

Auf ein Filterpapier wurde ein Tropfen des Oxidase-Reagenz gegeben. Darauf wurde eine Kolonie einer frischen Kultur ausgestrichen. Eine positive Reaktion wurde durch Verfärbung (lila-violett) sichtbar.

#### **2.18.8 Gram-Färbung**

Die Beschaffenheit der bakteriellen Zellwand wurde durch eine Gram-Färbung untersucht. Hierfür wurde eine Bakterienkolonie auf einem Objektträger hitzefixiert und das Gram-Färbekit (Sigma) wurde laut Herstellerangaben verwendet. Zusammengefasst wurden die Bakterien zuerst mit Kristallviolett für ca 1 min. gefärbt und anschließend mit Grams Jodlösung entfärbt. Anschließend wurde der Ausstrich mit Safranin gelb für ca. 1 min

gegengefärbt. Bakterien waren gram-positiv bei violetter Färbung. Bei pink Färbung waren sie gram-negativ. Für die Auswertung wurden die Bakterien unter einem Mikroskop mit einer 200x Vergrößerung betrachtet.

### **2.18.9 Anaerobe Kultivierung**

Die respiratorischen Ansprüche von des Bakteriums MW-C3 wurden durch die Kultivierung in anaeroben Milieu untersucht. Hierfür wurden Agarplatten ausgestrichen und in einem Anaerobentopf kultiviert. Für die Einstellung von sauerstofffreier Umgebung wurde Anaerocult® laut Herstellerangaben (Merck, Darmstadt) verwendet. Zur Überprüfung wurden Anaerostrips (ebenfalls Merck) in dem Topf angebracht. Die Kulturen wurden 2 Wochen bei 25°C inkubiert.

### **2.18.10 Test für Flexirubin-Pigmente**

Die Bildung von Pigmenten ist sehr verbreitet bei *Flavobacteriaceae*. Der Nachweis von Flexirubin-Pigmenten wurde daher durch das Fluten von Agarplatten mit den zu untersuchenden Bakterien durchgeführt. Dazu wurde die Platte mit 20 % (w/v) KOH-Lösung überschichtet. Bei einem Farbumschlag der Kolonien von gelb zu braun war die Reaktion positiv.

## **2.19 Fucoidanase-Aktivitätstest**

Um die hydrolytische Aktivität von Enzymlösungen zu bestimmen wurde ein Aktivitätstest durchgeführt. Dafür wurden 300 µl Fucoidanlösung (0,1 % (w/v) in ASW) mit 100 µl Enzymlösung gemischt und entweder bei Raumtemperatur oder 25 °C inkubiert. Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und zum Abstoppen der Reaktion bei 95 °C für 5 min erhitzt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels C-PAGE (Kapitel 2.20) oder HPLC-GPC (Kapitel 2.21).

## **2.20 Carbohydrate – Polyacrylamid Gel Electrophoresis (C-PAGE)**

Für die gelelektrophoretische Auftrennung des Fucoidans (Descamps *et al.*, 2006) wurde als Trenngel ein 27 % Polyacrylamidgel (PAA-Gel) verwendet, das mit einem 6% Sammelgel aus Polyacrylamid überschichtet wurde (Tabelle 2.25). Als Vorbereitung wurden 5 µl der Probe mit 15 µl Laufpuffer (10 % Sucrose) versetzt und aufgetragen.

**Tabelle 2.25: Zusammensetzung C-PAGE**

Substanz	Trenngel (27%)	Sammelgel (6%)
30 % Acrylamid-Mix	3 ml	0,333 ml
C-PAGE Puffer (20x)	200 µl	100 µl
H <sub>2</sub> O dest.	0,6 ml	1,56 ml
APS	26,6 µl	33,3 µl
TEMED	2,66 µl	1,33 µl

Für die Färbung des Gels wurde es 10 min in Alcianblau-Lösung (0,5 % (w/v) in dest. H<sub>2</sub>O) geschwenkt und anschließend mit dest. H<sub>2</sub>O ausgewaschen bis das Gel klar war (teilweise über Nacht). Um die Banden zu intensivieren, wurde ohne Schwenken das Gel für 10 min in 0,4 % (w/v) Silbernitratlösung im Dunkeln inkubiert. Das überschüssige Silbernitrat wurde dreifach je 1 min mit dest. H<sub>2</sub>O ausgewaschen. Durch die Zugabe von Natriumcarbonatlösung (7 % (w/v) in dest. H<sub>2</sub>O) und das Zupipettieren von 100 µl Formaldehyd (37 % (w/v)) wurden die Banden entwickelt. Bei ausreichender Intensität der Banden (grau) wurde die Reaktion mit Essigsäure (5 % (v/v)) gestoppt.

## 2.21 HPLC-GPC

Die Analyse und Auftrennung des heterogenen Fucoidans (breiter Molmassenbereich) bzw. der Hydrolyseprodukte wurde durch den Einsatz einer HPLC-GPC (Tabelle 2.26) ermöglicht.

**Tabelle 2.26: Auflistung der Geräte für HPLC-GPC**

Gerät	Bezeichnung
Pumpe	Merck-Hitachi L-7100
Autosampler	Merck-Hitachi L-7200
Säulenofen	Merck-Hitachi L-7300
Entgaser	Techlab
Säulen	PSS Suprema-Säulen 100 Å und 30.000 Å
RI-Detektor	Shodex RI-101
Visko-Detektor	WGE η-1000

Proben, die mit der HPLC-GPC vermessen wurden, wurden, soweit möglich, in NaN<sub>3</sub>-Lösung (0,2 % (w/v)), die gleichzeitig als Laufmittel diente, gelöst. Eine Zusammenfassung der Parameter für die Messung ist in Tabelle 2.27 aufgelistet. Die Fließgeschwindigkeit lag bei 0,5 ml/min. Als Konzentrationsdetektor wurde das RI-Signal gemessen und die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte über die Messung mit einem Viskosimeter.

**Tabelle 2.27: Parameter für Messungen mit HPLC-GPC**

Parameter	Einstellung
Laufmittel	0,2 g/l NaN <sub>3</sub>
Laufgeschwindigkeit	0,5 ml/min
Säulentemperatur	75 °C
Kalibrierung	Pullulan

Die Auswertung der Messdaten erfolgte durch die GPC Software PSS WinGPC Unity von Polymer Standards Service (Mainz, Deutschland) und DataApex Clarity<sup>TM</sup> (Prag, Tschechien).

### Konstruktion eines Stützpunktes

Da von dem Referenzstandard aus Pullulan als höchstes ein Molekulargewicht von 1,6 M Da verfügbar ist, wurde ein Stützpunkt aus der Mark-Houwink-Beziehung für die universelle Kalibrierung errechnet. Dazu wurde aus den Pullulan-Standards eine lineare Standardkalibrierung erstellt. Für das Elutionsvolumen von 12 ml (Ausschlussgrenze der verwendeten Säulen) wurde das Molekulargewicht aus dieser Kalibrierkurve bestimmt. Anschließend wurden die Konstanten (MH-K und MH- $\alpha$ ) aus dem Programm PSS WinGPC für die Standards ausgelesen; nur die Molekulargewichte oberhalb von 20 kDa wurden für die Bestimmung verwendet. Die Konstanten wurden mit dem Molekulargewicht in die Mark-Houwink-Beziehung eingesetzt. Als Wert wurde die theoretische intrinsische Viskosität für Pullulan, das ein Elutionsvolumen von 12 ml besitzt, errechnet. Dieser Wert wurde der universellen Kalibrierung als Stützpunkt hinzugefügt und die Kalibrierung wurde erneut mit einem Polynom dritter Ordnung durchgeführt.

## 2.22 Ammoniumsulfatfällung zur Enzymisolierung

Für die Aufkonzentrierung von Proteinen im Kulturüberstand wurde eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Hierzu wurde der zellfreie Überstand mit der gewünschten Konzentration an Ammoniumsulfat (40 % (w/v), 60 % (w/v) oder 80 % (w/v)) versetzt und mindestens 4 Stunden (ggf. über Nacht) bei 4 °C zum Präzipitieren stehen gelassen. Die ausgefallenen Proteine wurden dann durch Zentrifugation (4.000 rpm, 20 min) pelletiert. Entweder wurde der Überstand für eine weitere Fällung verwendet oder verworfen. Das Proteinpellet wurde in 50 mM TrisHCl-Puffer (pH 7,5) gelöst und bei 4 °C über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert.

### **2.23 Anreicherung des Enzyms aus dem Kulturüberstand**

Von der Bioreaktorkultivierung wurden die produzierten extrazellulären Proteine aufgearbeitet, um sie für eine enzymatische Spaltung des Fucoidans einzusetzen. Hierfür wurde der Kulturüberstand von der Biomasse durch Zentrifugation getrennt. Der Überstand wurde dann durch einen Cellulose Acetat Filter (0,45 µm) gefiltert und mit einer Vivaflow 200 Einheit ultrafiltriert (MWCO: 10kDa). Das Retentat wurde durch eine 60 % (w/v) Ammoniumsulfatfällung bei 4°C gefällt (24 h). Das Filtrat hingegen wurde verworfen. Die gefällten Proteine wurden abzentrifugiert, in 50 mM TrisHCl-Puffer (pH 7,5) gelöst und gegen Puffer dialysiert.

### **2.24 Enzymatische Spaltung von Fucoidan**

Für die Herstellung von Fucooligosacchariden aus nativem Fucoidan wurde die Enzymlösung, die aus der Anreicherung des Kulturüberstandes erhalten wurde (Kapitel 2.23), eingesetzt. Hierzu wurden 1,17 g Fucoidan (*Fucus vesiculosus*) in 200 ml Enzymlösung gelöst und 7 Tage bei 25°C inkubiert. Täglich wurden Proben genommen und durch Erhitzen für 5 min auf 95 °C gestoppt. Die vollständige Reaktion wurde durch Autoklavieren der Lösung beendet.

Unlösliche Bestandteile des Fucoidans wurden durch Zentrifugieren (4.000 rpm, 15 min) entfernt. Die gespaltenen Oligosaccharide wurden durch eine Ultrafiltration (Vivaflow 200; MWCO: 50 kDa) abgetrennt und gefriergetrocknet.

#### **2.24.1 Aufreinigung der Oligosaccharide**

Die Entsalzung der Oligosaccharide wurde mit einer Sephadex G10 SEC Material (GE Healthcare, München) an einer FPLC der Marke BioRad (München, Biologic Duoflow) durchgeführt (Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, TU KL). Es wurde eine Flussrate von 0,2 ml/min, eingestellt. Das Probenvolumen lag bei 10 ml mit einer Konzentration von 5 mg/ml. Die Detektion in den Fraktionen erfolgte mittels Konduktivität und Toluidin Blue (TB)-Nachweis. Die Proben wurden mit einem Biologic BioFrac Fraction Collector (BioRad, München) gesammelt und gepoolt. Anschließend wurden die Proben gefriergetrocknet.

#### **2.24.2 Toluidin Blue-Nachweis von sulfatierten Polysacchariden**

Für den Nachweis von Fucoidan nach der Entsalzung mithilfe einer FPLC wurden 10 µl Probe zu 0,06 mM Toluidine Blue (TB) in 20 mM Maleinsäurepuffer (pH 1) gegeben. Mit steigender Fucoidankonzentration wird die Abnahme der Absorption bei 632 nm betrachtet.



## **2.25 Elementaranalyse**

Die Zusammensetzung von Fucoidan und seinen Spaltprodukten wurde mittels Elementaranalyse durchgeführt (Institut für Pharmazeutische Chemie, TU BS). Hierfür wurde die Anlage CE Instruments Flash EA<sup>®</sup> 1112 Elemental Analyzer der Firma Thermo Quest (Dreieich) verwendet.

### **2.25.1 Infrarotspektrometrie**

Die Untersuchung von Spaltprodukten des Fucoidans mittels Infrarotspektrometrie wurde mit einem FT-IR-Spectrometer Spectrum 100 von Perkin Elmer (Waltham, USA) durchgeführt (Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, TU KL). Hierfür wurden gefriergetrocknete Proben vermessen.

### 3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in zwei Abschnitte: zunächst wird die rekombinante Expression einer Fucoidanase („sulfated fucanase“ FcnA), die aus dem marinen Bakterium *Mariniflexile fucanivorans* stammt, beschrieben (Kapitel 3.1). Anschließend wird die Isolierung und Charakterisierung eines marinen Bakteriums vorgestellt, das ebenfalls für die Hydrolyse von Fucoidan verwendet wurde (Kapitel 3.2 -3.5).

Bei dem verwendeten Fucoidan handelt es sich um einen selbst hergestellten Extrakt aus der Braunalge *Fucus vesiculosus*, die vom Südstrand in Wilhelmshaven (Nordsee) gesammelt wurde. Aus 100 g getrocknetem und entfärbtem Algenpulver können durch die angewandte Methode ca. 1-2 g Fucoidan extrahiert werden. Es setzt sich aus Fucose (78 %), Glucose (9 %), Galactose (8 %), Xylose (3 %) und Mannose (1 %) zusammen und der Sulfatgehalt beträgt 8 % (Holtkamp, 2009).

#### 3.1 Produktion einer Fucoidanase FcnA aus *Mariniflexile fucanivorans*

Das aus dem Abwasser einer Alginatfabrik in Frankreich isolierte Bakterium *Mariniflexile fucanivorans* wurde von der DSMZ in Braunschweig bezogen. Laut Veröffentlichung ist es in der Lage, Fucoidan von den Algen *Pelvetia canaliculata* und *Ascophyllum nodosum* zu spalten. Die Fucoidanase-Aktivität wurde einem extrazellulären Enzym zugeordnet, das eine Größe von 107 kDa besitzt. Die Gensequenz von FcnA wurde von Colin *et al.* (2006) ermittelt und gehört der Familie 107 der Glycosylhydrolasen (GH107) an. Da die Hydrolyse des Fucoidans in Vordergrund stand, sollte ein Konstrukt kloniert werden, mithilfe dessen das Enzym überexprimiert wird.

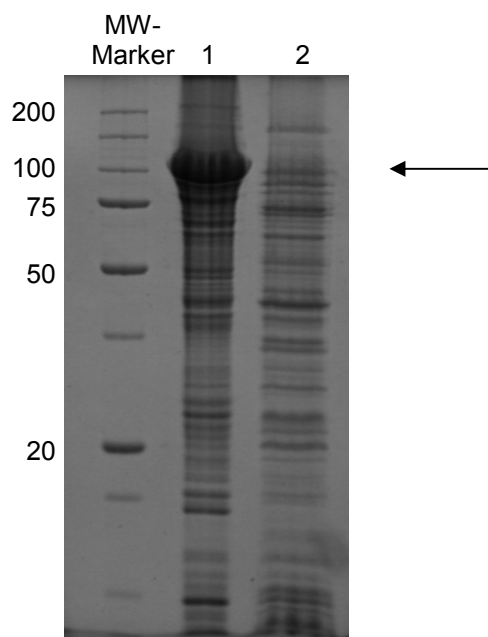
##### 3.1.1 Expression von Fucoidanase *fcnA* in pET21a(+)

Zur Klonierung in den Vektor pET21a(+) wurde von genomischer DNA des Bakteriums *Mariniflexile fucanivorans* eine PCR mit Primern (LK-fcnA\_f und LK-fcnA\_r) durchgeführt, die bereits Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen NdeI und XhoI beinhalten.

Anschließend wurden der Vektor und das amplifizierte Gen mit den beiden Restriktionsendonukleasen inkubiert. Nach der Ligation wurde das Konstrukt in *E. coli* BLR(DE3) transformiert.

Um den Erfolg der Transformation zu überprüfen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Klone mit Insertgröße, die dem Gen *fcnA* entsprachen, wurden sequenziert. Eine

Überexpression nach Induktion mit 1mM IPTG bei 37 °C wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 3.1). Die Proben wurden drei Stunden nach Induktion entnommen. Diese wurden aufgeschlossen und Zellaufschluss sowie Zelltrümmer (Pellet) wurden aufgetragen. In Abbildung 3.1 sind beide Fraktionen aufgetragen. Bei einer relativen Größe von 100 kDa liegt eine Bande mit hoher Proteinkonzentration vor, jedoch in der Fraktion der unlöslichen Zelltrümmer. In der löslichen Fraktion des Zellaufschlusses kann keine Überexpression des Proteins erkannt werden.



**Abbildung 3.1: SDS-PAGE einer Expression der Fucoidanase *fcnA* in *E.coli* BLR(DE3).**

Bedingungen: 2xTY-A-Medium: 1 % Glucose; Induktion: 1mM IPTG, 37 °C; Probennahme: 3 Stunden nach Induktion; Zellaufschluss mit BugBuster Mastermix; Spur 1: Pellet, Spur 2: Zellaufschluß.

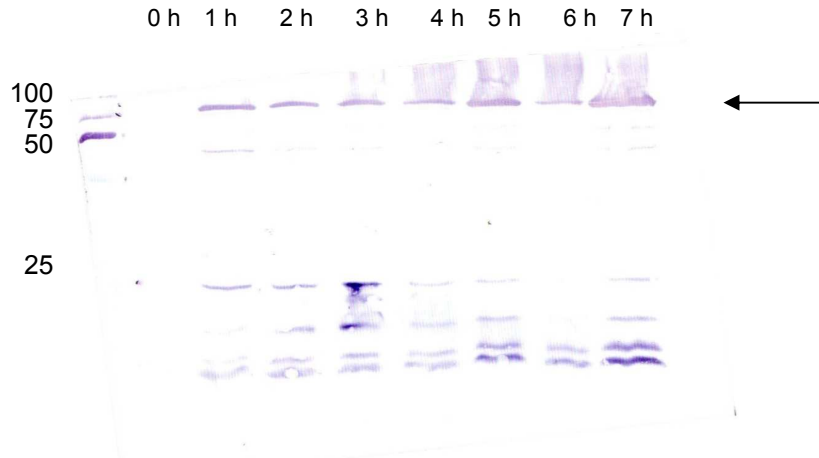
Es wurde anschließend die Expression in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen von IPTG und verschiedenen Expressionstemperaturen untersucht. Zusätzlich wurden weitere *E.coli* Stämme eingesetzt, die verbesserte Eigenschaften für die Expression von Proteinen besitzen. In Tabelle 3.1 sind die Parameter aufgeführt, die untersucht wurden, um eine lösliche Produktion des Proteins zu erzielen.

**Tabelle 3.1: Randbedingungen für die Expressionsanalyse von pET21a(+)-fcnA.**

Bedingungen: 2xTY-A-Medium; Induktion: variable Temperatur und IPTG-Konzentration; Zellaufschluss mit BugBuster Mastermix; +: Analyse wurde durchgeführt, n.d.: Analyse wurde nicht durchgeführt.

<i>E.coli</i> Stamm	IPTG-Konzentration (mM)	Temperatur (°C)				
		17	20	25	30	37
BLR(DE3)	0,1	+	+	+	+	n.d.
	0,2	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.
	0,5	n.d.	+	+	+	n.d.
	1	+	+	+	+	+
Rosetta	0,1	n.d.	+	+	n.d.	n.d.
	0,5	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.
	1	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.
Origami 2	0,05	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	0,1	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.
	1	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.

Die Zugabe von Glucose (1 %(w/v)) zu dem Medium führte zu keiner Verbesserung der löslichen Expression und verhinderte die Bildung von ‚Inclusion bodies‘ nicht. Für den direkten Nachweis des Enzyms wurde von der Fraktion des Zellpellets ein Western Blot erstellt (Abbildung 3.2). Der Nachweis des His-Tag bei einem Molekulargewicht von 100 kDa ist hierbei gut zu erkennen. Es gibt zudem Banden, die kleineren Molekulargewichten entsprechen.

**Abbildung 3.2: Western Blot des Pellets der Kultivierung von *E. coli* BLR(DE3)-pET21a(+)-fcnA.**

Bedingungen: 2xTY-A-Mediums; Induktion: 0,2 mM IPTG bei 30 °C; Zellaufschluss mit BugBuster Mastermix. Zahlen geben Stunden nach Induktion an.

Das Enzym FcnA konnte überexprimiert werden; jedoch wurde unter den gewählten Bedingungen kein lösliches Protein produziert.

### 3.1.2 Expression von Fucoidanase FcnA in pET21a(+)-pelB

Da die Produktion der Fucoidanase FcnA in *E. coli* mit dem Vektor pET21a(+) nicht erfolgreich war, wurde das Gen in den Vektor pET21a(+)-pelB mit zwei verschiedenen

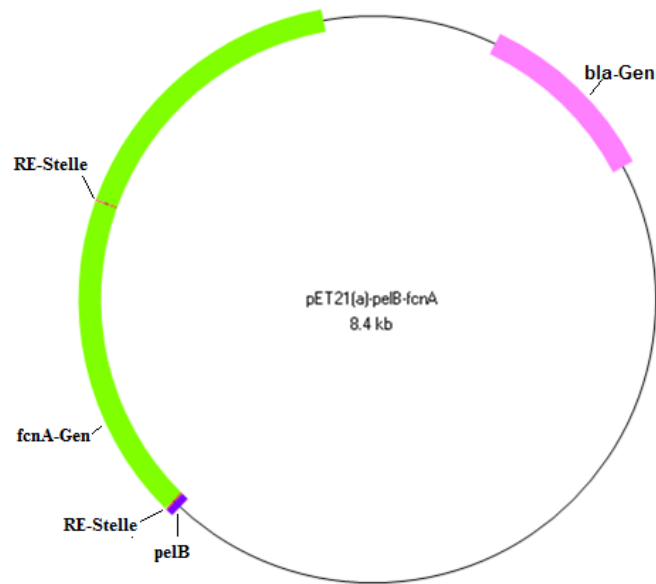
Ansätzen kloniert. Das Signalpeptid pelB sollte dazu dienen, dass das Protein durch den sekretorischen Pfad (*sec*-Pathway) vor der Faltung in das Periplasma transportiert wird. Das Protein, und damit die Faltung, wird in diesem Kompartiment durchgeführt. Durch sogenanntes ‚Leakage‘ kann das Enzym in den extrazellulären Raum gelangen. Da die Fucoidanase in *M. fucanivorans* extrazellulär produziert wird, könnte es daran liegen, dass das Protein im Cytoplasma nicht richtig gefaltet wird und sich zu Inclusion bodies aggregiert.

Für die Klonierung wurden zwei Forwardprimer verwendet. Zum Einen wurde im Forwardprimer die Erkennungssequenz für NheI und im zweiten Primer für NcoI eingefügt. Damit für die Klonierung mit dem Restriktionsenzym NheI die Tripletfolge der Gensequenz nicht verschoben ist, wurden zwei zusätzliche Aminosäuren eingefügt, die für jeweils ein zusätzliches Alanin und Serin kodieren. Bei der zweiten Variante der Klonierung wurden das Triplet GCC eingefügt, das ebenfalls für Alanin kodiert (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2: Basenfolge des Vektors im Bereich des Übergangs von pelB-Leadersequenz zum Gen *fcnA*;** pelB-Leadersequenz, Restriktionsstelle, zusätzliche Basen, Anfangssequenz *fcnA*.

Restriktions- enzym	Übergang pelB zu <i>fcnA</i>
NheI	ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTC AGCCGGCCATG <b>GCT AGC</b> CAAGTACCAGATCCAAACC
NcoI	ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTC AGCCGG <b>CCATGCC</b> CAAGTACCAGATCCAAACC

Die Herausforderung bei der NcoI-Schnittstelle ist, dass sich eine weitere Schnittstelle innerhalb des Gens von *fcnA* befindet und dadurch zwei Fragmente in den Vektor kloniert werden müssen. In Abbildung 3.3 ist der Vektor pET21a(+)-pelB-*fcnA* dargestellt.



**Abbildung 3.3: Darstellung des Vektors pET21a(+)-pelB-fcnA.** Gezeigt sind das Gen *fcnA* sowie die Erkennungsstellen für die Restriktionsendonuklease (RE-Stellen) und das *bla*-Gen für die Ampicillin-Resistenz.

Für die Klonierung wurden mehrere Insert:Vektor-Verhältnisse ausprobiert (Tabelle 3.3). Erst ein sehr hohes Insert:Vektor-Verhältnis brachte positive Klone hervor.

**Tabelle 3.3: Übersicht der durchgeführten Ligationsansätze von pET21a(+) mit *fcnA*;**  
Auswertung: +: erfolgreiche Klonierung -: keine Klone, (+): falsch positive Klone, \*: nur eine Hälfte des Inserts kloniert.

Insertmenge	Vektor NcoI (50 ng)	Vektor NheI (50 ng)
15 ng	-	-
30 ng	-	-
45 ng	-	-
60 ng	(+)	-
75 ng	(+)*	(+)
81 ng	(+)	(+)
90 ng	(+)	(+)
105 ng	(+)*	(+)
120 ng	(+)	(+)
135 ng	(+)*	(+)
150 ng	(+)	(+)
165 ng	(+)*	+
180 ng	(+)*	+

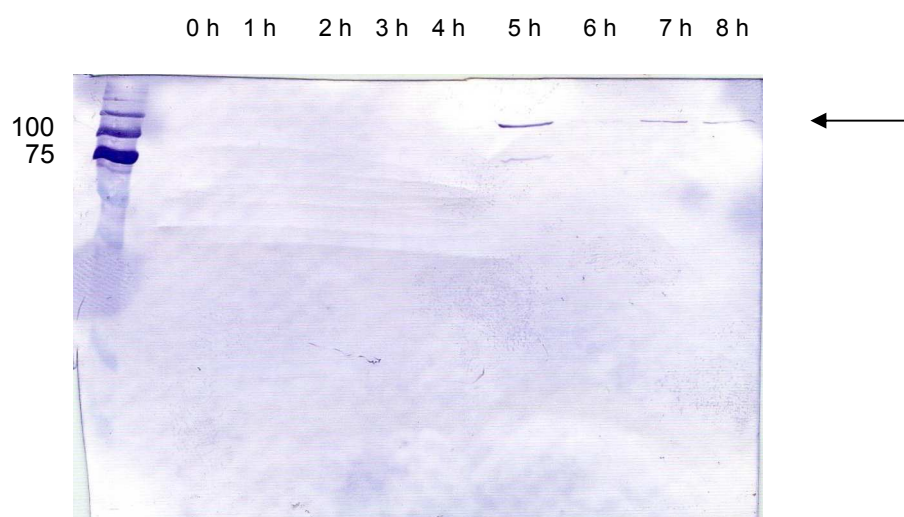
Die positiven Klone wurden sequenziert. Durch die Sequenz von *pelB* wird das Protein in den periplasmatischen Raum transportiert. Daher kann bei erfolgreicher Produktion das Protein im Kulturüberstand nachgewiesen werden. In Tabelle 3.4 sind die Parameter für die Expression des Vektors aufgeführt.

**Tabelle 3.4: Expressionsanalyse von *E. coli* BLR(DE3)-pET21a(+)-pelB-fcnA mit Variation der IPTG-Konzentration und der Expressionstemperatur.**

Bedingungen: 2xTY-A-Medium, Induktion: variable Temperatur und IPTG-Konzentration; Zellaufschluss mit BugBuster Mastermix; P: Pellet, Z: Zellaufschluss, K: Kulturüberstand. Nachweis durch Western Blot. +: Nachweis des rekombinanten Proteins, -: kein Nachweis des rekombinanten Proteins, n.d.: nicht durchgeführt.

IPTG (mM)	17 °C		20 °C		25 °C			30 °C		
	Z	K	Z	K	P	Z	K	P	Z	K
0,1	-	+	-	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0,5	-	+	-	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-

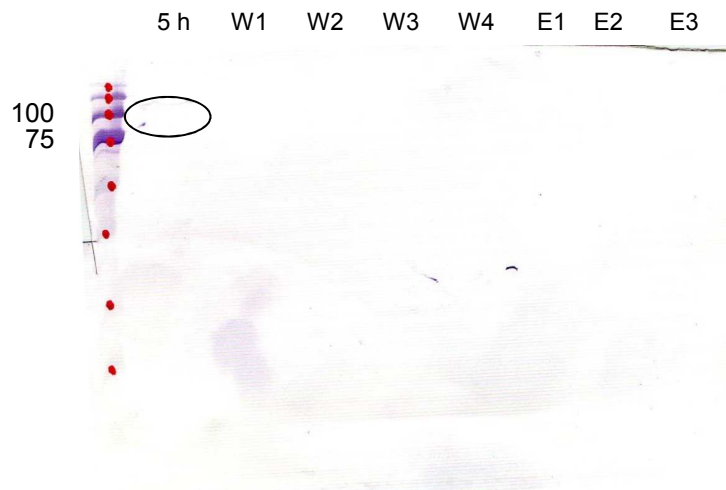
Bei Expressionstemperaturen unter 20 °C konnte das Protein im Kulturüberstand durch einen Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4: Abbildung des Western Blots der Kultivierung von *E. coli* BLR(DE3)-pET21a(+)-pelB-fcnA.**

Bedingungen: 2xTY-A-Medium, Induktion: 1 mM IPTG bei 17 °C; Proben entnommen aus Kulturüberstand. Zahlen geben Stunden nach Induktion an.

Bei der Färbung des Western Blots sieht man, dass das Enzym im Kulturüberstand nur in geringen Mengen vorliegt. Es ist erst nach fünf Stunden nachweisbar. Trotz dieser sehr geringen Proteinkonzentration im Kulturüberstand wurde eine Aufreinigung über Nickel-His-Sepharose durchgeführt. Die Fraktionen der Aufreinigung sind in Abbildung 3.5 abgebildet.



**Abbildung 3.5: Western Blot der Aufreinigungsfractionen.**

Aufgetragen sind Kulturüberstand nach 5 h (Bande umrandet). Waschfraktionen 1-4 (W1-W4) und Elutionsfraktionen 1-3 (E1-E3).

Nach dem Waschen konnte das Protein durch den Western Blot nicht mehr nachgewiesen werden, weder in der Waschlösung noch in der Elutionsfraktion.

### Zusammenfassung

Die Fucoidanase FcnA aus *Mariniflexile fucanivorans* wurde erfolgreich in die Vektoren pET21a(+) und pET21a(+)-pelB kloniert. Die lösliche Expression des Proteins erfolgte in sehr geringen Mengen in dem Vektor mit der Signalsequenz (pelB). Die Aufreinigung des Enzyms mittels Ni-Sepharose war aufgrund der geringen Konzentration nicht möglich.

## 3.2 Isolierung mariner Mikroorganismen mit Fucoidanase-Potenzial

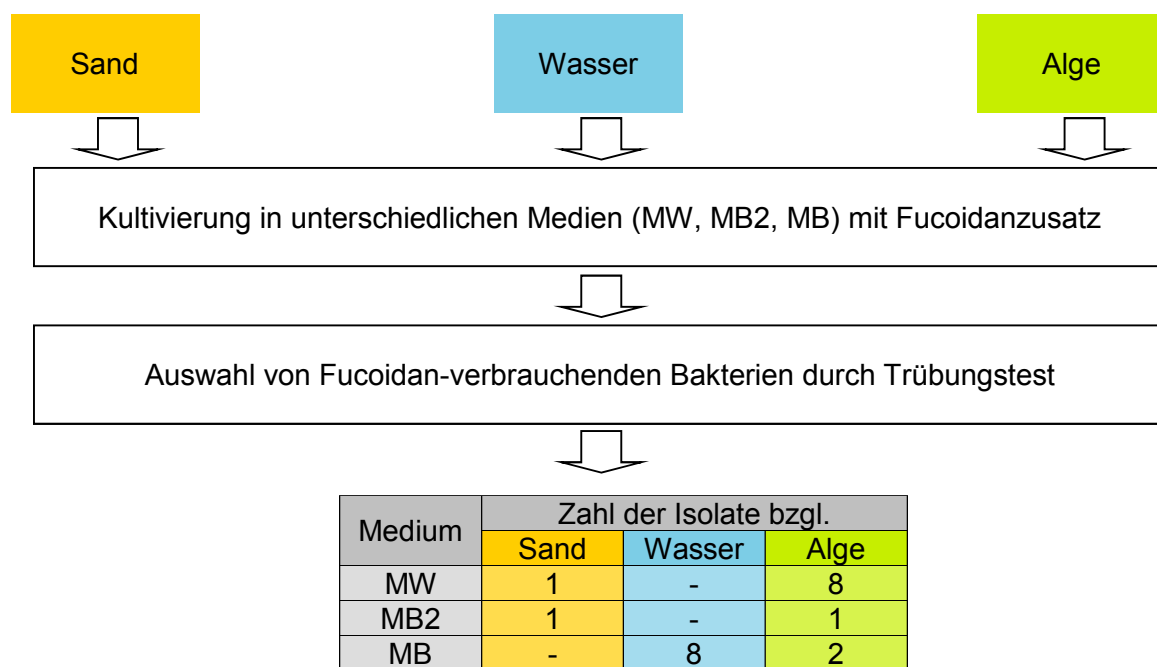
Da die bekannte Fucoidanase aus *M. fucanivorans* heterolog löslich nur in geringen Mengen exprimiert werden konnte, sollte ein marines Bakterium isoliert werden, das in der Lage ist, Fucoidan hydrolytisch zu spalten.

Aus Proben von der Sammelstelle der Alge *Fucus vesiculosus* am Südstrand in Wilhelmshaven (Nordsee) wurden Mikroorganismen isoliert, um potentielle Fucoidanase-Produzenten zu erhalten. Die Strategie bestand darin, Teile der Alge oder auch Material aus deren Umgebung zu verwenden.

Diesen Mikroorganismen wurde durch Zugabe von Fucoidan in verschiedenen Medien ein Wachstumsvorteil verschafft. In Abbildung 3.6 ist ein Schema dargestellt, das die Abfolge der Isolierung beschreibt.



Damit möglichst viele Stämme untersucht werden konnten und bereits bei der Auswahl der Mikroorganismen die Verwertung von Fucoidan aus dem Medium berücksichtigt wurde, wurden einzelne Kolonien gepickt und in Mikrotiterplatten (MTP) kultiviert (Kapitel 2.16). Dies hatte den Vorteil, dass sowohl eine große Zahl an Kolonien untersucht werden konnte und zusätzlich der Arbeitsaufwand überschaubar blieb. Auf diese Weise wurden 282 einzelne Klone von drei unterschiedlichen Isolierungsmedien durch das Screening untersucht (Kapitel 2.16.1). Hauptaugenmerk beim Screening galt der Abnahme der Fucoidankonzentration nach 7 Tagen Inkubationszeit bei 25 °C, die durch die Abnahme der Trübung im Trübungstest nach Kitamikado (Kapitel 2.14.3) nachgewiesen wurde. Bei diesem Test werden anionische Polysaccharide als Trübung durch Interaktion mit einer BSA-Lösung (pH 3,7) nachgewiesen. Insgesamt wurden durch dieses Verfahren 21 Bakterien isoliert, deren Bezeichnung und Ursprung in Tabelle 3.5 zusammengefasst sind.



**Abbildung 3.6: Schema der Isolierung von fucoidanabbauenden Mikroorganismen**

Dabei wurden zwei Isolate aus Sand, 8 Isolate aus Wasser und 11 Isolate von der Alge *Fucus vesiculosus* gewonnen. Diese isolierten Mikroorganismen wurden für weitere Tests zum enzymatischen Abbau von Fucoidan eingesetzt (Tabelle 3.5).

**Tabelle 3.5: Liste der selbstisolierten Mikroorganismen aus Wilhelmshaven**

Isolat	Ursprung	Medium	Isolat	Ursprung	Medium
MB-A3	Wasser	MB	MB2-C12	Alge	MB2
MB-A4	Wasser	MB	MW-A3	Alge	MW
MB-A5	Wasser	MB	MW-A4	Alge	MW
MB-A6	Wasser	MB	MW-A10	Alge	MW
MB-A9	Wasser	MB	MW-A11	Alge	MW
MB-A11	Wasser	MB	MW-B6	Alge	MW
MB-A12	Wasser	MB	MW-B10	Alge	MW
MB-B2	Wasser	MB	MW-B12	Alge	MW
MB-E12	Alge	MB	MW-C3	Alge	MW
MB-F7	Alge	MB	MW-C9	Sand	MW
MB2-A1	Sand	MB2			

Da das Kriterium für die Isolierung der Mikroorganismen auf der Abnahme des Fucoidans im Überstand beruht, ist die Fucoidanase-Aktivität nur indirekt nachgewiesen. Weiterführende Untersuchungen dienten dem Nachweis der Enzymaktivität.

### **3.2.1 Wachstumseigenschaften verschiedener Mikroorganismen mit potentieller Fucoidanase-Aktivität**

Um das Potenzial der verschiedenen Mikroorganismen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, fucoidanspaltende Enzyme produzieren zu können, genauer zu charakterisieren, wurden Kultivierungsversuche durchgeführt. Einerseits sollten Kultivierungsbedingungen gefunden werden, die schon frühzeitig auf den Abbau von Fucoidan hinweisen, andererseits sollte getestet werden, inwieweit künstliches Meerwasser (ASW) mit Zusätzen (C-, P-, N-Quellen) für eine Kultivierung der Mikroorganismen ausreichend ist.

Fucoidan ist ein sulfatiertes Polysaccharid, das hauptsächlich aus sulfatierter Fucose besteht. Zudem wurde für das Fucoidan von *Fucus vesiculosus* nachgewiesen, dass es weitere Monosaccharide wie z.B. Glucose, Mannose, Xylose und Galactose enthält.

Geht man davon aus, dass Fucoidan nur aus diesen Monosacchariden besteht, müssten theoretisch alle Mikroorganismen, die Fucoidan als einzige Kohlenstoffquelle nutzen können, auch diese Monosaccharide verwerten können.

Zu diesem Zweck wurden die Isolate auf künstlichem Meerwasser mit dem Zusatz von verschiedenen Monosacchariden (Glucose, Fucose, Galactose, Mannose und Xylose; je 1 g/l) inkubiert. Zusätzlich wurden jene Isolate auch mit Fucoidan inkubiert, die auf diesem Medium wachsen konnten. In Tabelle 3.6 sind alle Organismen aufgelistet, die Wachstum (Zunahme der OD<sub>600</sub>) auf diesem Medium nach Vorkultur auf MB2-Medium gezeigt haben.

**Tabelle 3.6: Einfluss verschiedener Kohlenhydrate bzw. von Fucoidan auf das Wachstum von marinen Isolaten.**

Bedingungen: 20 ml Schüttelkulturen; ASW-Medium: Zuckerquelle (1 g/l), nNatriumnitrat (0,549 mM); Anfangs-pH: 7,4, 25 °C, 150 rpm; 3 Tage; Vorkultur: MB2 + Fucoidan (1 g/l); +: Wachstum; -: kein Wachstum.

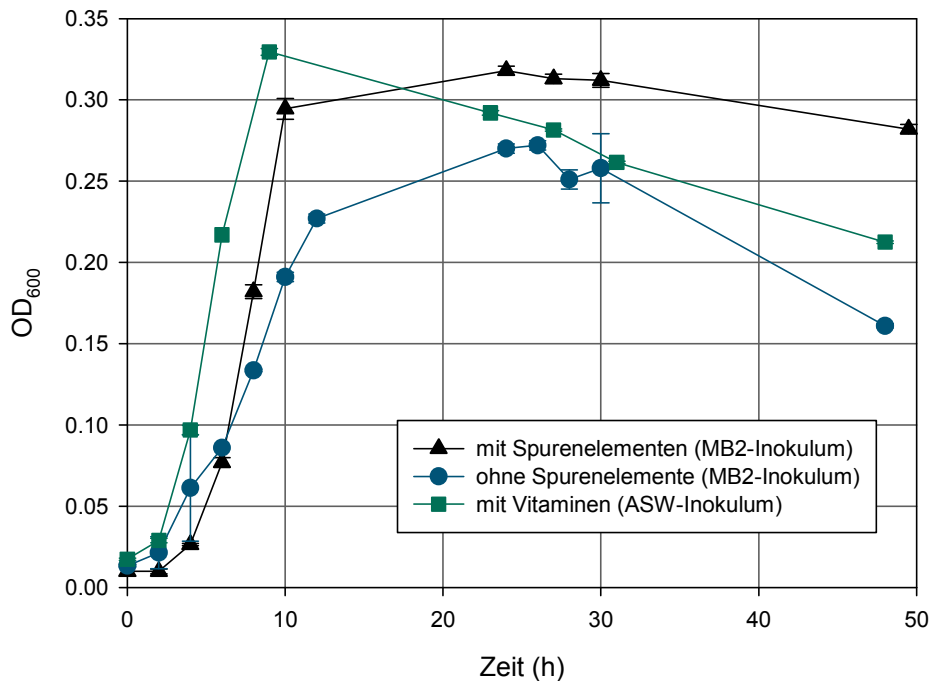
Organismus	Glucose	Fucose	Galactose	Mannose	Xylose	Fucoidan
MW-A4	+	-	-	+	-	+
MW-A11 a	+	-	+	+	-	-
MW-A11 b	+	-	+	-	+	-
MW-B1	+	-	-	+	-	-
MW-B2	+	-	-	+	-	-
MW-B6	+	+	-	+	-	-
MW-B10	+	-	-	+	-	-
MW-C2	+	-	-	+	-	-
MW-C3	+	+	+	-	+	+
MW-C6	+	+	-	+	-	-
MW-C9	+	+	-	+	-	-
MB2-A1	+	+	+	+	+	-
MB2-C12	+	+	+	+	+	+

Die selbstisolierten Stämme, die auf MB-Medium mit dem Zusatz von Fucoidan isoliert wurden, waren nicht in der Lage, auf künstlichem Meerwasser (ASW) als definiertem Basismedium zu wachsen.

Obwohl mehrere Organismen in der Lage waren, Fucose als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen, zeigten nur drei Isolate auf dem Medium ASW mit dem Zusatz von Fucoidan Wachstum.

Da das Vorkulturmedium Komplexbestandteile wie Hefeextrakt und Pepton enthielt, wurde zusätzlich getestet, ob die drei Organismen weiterhin in der Lage waren, auf ASW mit Fucoidan (1g/l) wachsen zu können, wenn die Vorkultur ebenfalls aus definiertem Medium bestand. Jedoch war allein der Stamm MW-C3 hierzu in der Lage und wurde deswegen für die weiteren Versuche verwendet. In Abbildung 3.7 ist der Verlauf der optischen Dichte gezeigt. Die Darstellung zeigt den Einfluss mehrerer Zusätze unterschiedlicher Vorkulturmedien auf das Wachstum. Es war kein Wachstum zu erkennen, wenn MW-C3 in ASW mit Fucoidan kultiviert wurde und das Vorkulturmedium keine Komplexbestandteile oder Vitamine enthielt (nicht gezeigt). Jedoch konnte das Isolat bei der Verwendung von Komplexbestandteilen im Vorkulturmedium auf dem Medium ASW mit Fucoidan (ohne Vitaminlösung) wachsen. Ebenfalls war Wachstum zu erkennen, wenn das Isolat MW-C3 durch ein Inokulum aus ASW mit Fucoidan und dem Zusatz von Vitaminen beimpft wurde und auf demselben Nährmedium kultiviert wurde. Zusätzlich konnte durch den Zusatz von Vitaminlösung (Thiamin, Biotin und Vitamin B12) eine höhere optische Dichte  $OD_{600}$  erreicht werden. Das Selbstisolat MW-C3 benötigt demnach für das Wachstum auf

künstlichem Meerwasser und Fucoidan als Zusatz Vitamine, jedoch keine weiteren Komplexbestandteile im Nährmedium.



**Abbildung 3.7: Einfluss von Vorkultur und verschiedenen Zusätzen auf das Wachstum von MW-C3.** Bedingung: 20 ml Schüttelkulturen; ASW-Medium: Fucoidan (1 g/l) mit Natriumnitrat (0,549 mM); Anfangs-pH 7,4, 25 °C, 150 rpm; verschiedenen Zusätze und unterschiedlichem Inokulum (ASW + Fucoidan (1 g/l) + Natriumnitrat (0,549 mM) oder MB2 + Fucoidan (1 g/l)).

## Zusammenfassung

Für die Spaltung von Fucoidan aus *Fucus vesiculosus* wurden von der Sammelstelle der Alge Proben (Wasser, Sand und Alge) genommen, um daraus marine Mikroorganismen mit Fucoidanase-Aktivität zu isolieren. Aus ca. 20 Isolaten wurde das bakterielle Isolat MW-C3 ausgewählt, da es auf selbstextrahiertem Fucoidan als einziger Kohlenstoffquelle wachsen konnte.

## 3.3 Charakterisierung des bakteriellen Isolats MW-C3

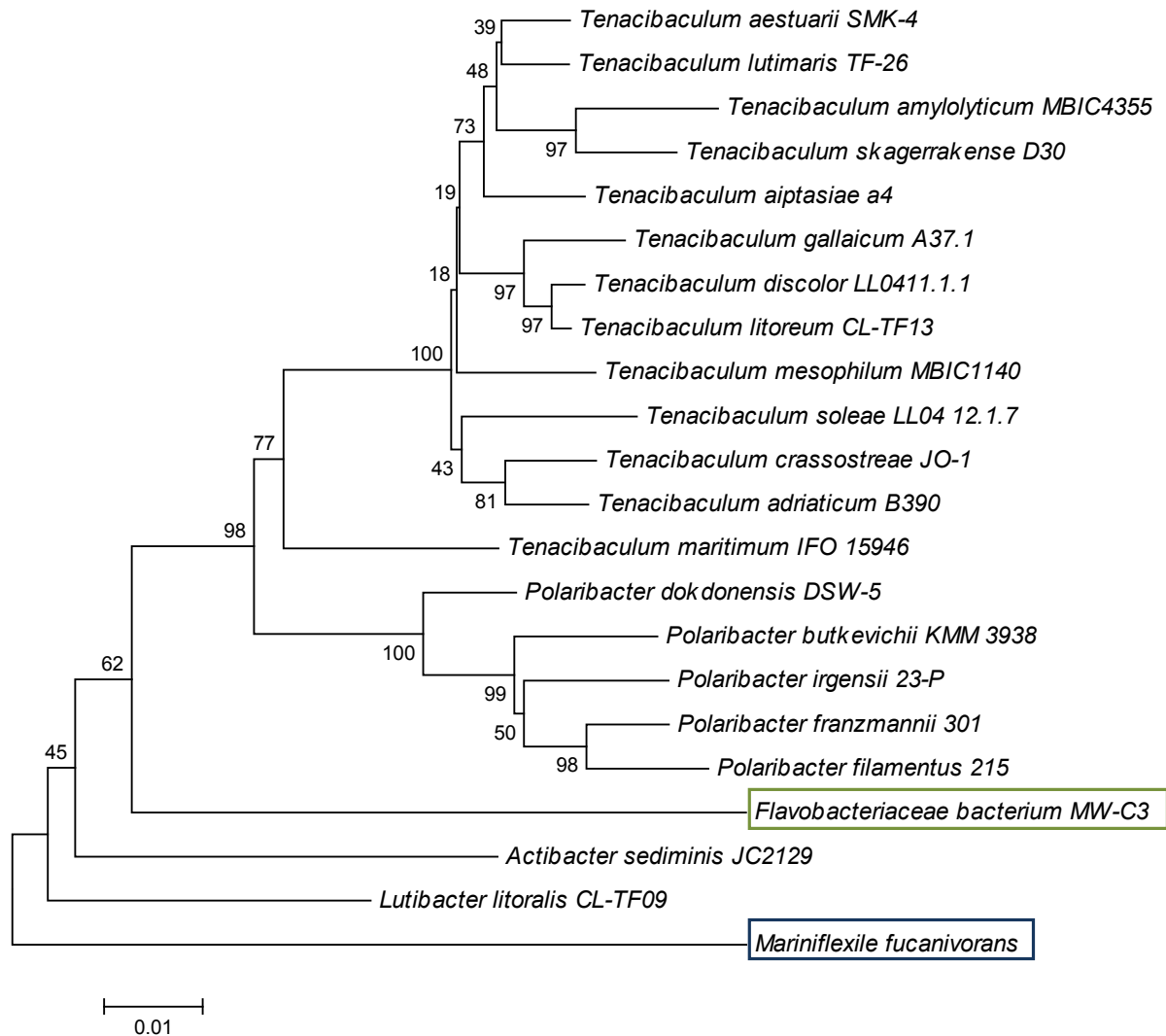
Da der selbstisolierte Stamm MW-C3 Fucoidan als einzige Kohlenstoffquelle verwerten konnte, wurde die Identifizierung des Stammes durchgeführt. Die Einordnung sollte über Sequenzierung der 16S rDNA erfolgen. Zur weiteren Charakterisierung wurden phänotypische und biochemische Untersuchungen durchgeführt, um den Organismus abschließend phylogenetisch einordnen zu können.

### 3.3.1 Sequenzierung der 16S rDNA

Basierend auf der stark konservierten Sequenz der 16S rDNA, die Bestandteil der Untereinheit der Ribosomen in den Bakterien ist, werden darüber häufig die verwandtschaftlichen Verhältnisse zwischen Bakterien bestimmt.

Nachdem die Sequenz in der Firma BioSolutions Halle (Halle) bestimmt wurde, wurde in der Datenbank des ‚Ribosomal Database Projects‘ nach anerkannten Typstämmen gesucht. Im Anhang (Tabelle 10.3) sind die Typstämmen von Bakterien, die als nahe Verwandte bestimmt wurden, aufgelistet. Die Sequenzübereinstimmung wurde anhand eines BLAST-Query bestimmt. Demzufolge gehört der Stamm MW-C3 der Familie der *Flavobacteriaceae* an. Mit einer Sequenzübereinstimmung von 91,30 % besitzt *Lutibacter litoralis* CL-TF09 die höchste Sequenzidentität, gefolgt von *Tenacibaculum maritimum* IFO 15946 (91,27 %) und *Polaribacter dokdonensis* DSW-5 (90,93 %) (Zhang *et al.*, 2000).

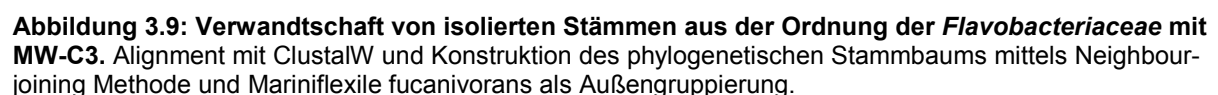
Um die verwandtschaftlichen Beziehungen darzustellen, wurde ein phylogenetischer Stammbaum mithilfe des Programms MEGA5 erstellt. Die Berechnung erfolgte durch mehrere Ansätze (Maximum Likelihood, Neighbour joining und Minimal Evolution). In Abbildung 3.8 ist die Konstruktion mit der Neighbour-joining Methode inklusive *Mariniflexile fucanivorans* dargestellt. Das Alignment wurde durch ClustalW erstellt.



**Abbildung 3.8: Verwandtschaft von Typstämmen aus der Familie der *Flavobacteriaceae* mit MW-C3.** Alignment mit ClustalW und Konstruktion des phylogenetischen Stammbaums mittels Neighbour-joining Methode und *Mariniflexile fucanivorans* als Außengruppierung.

Der erstellte phylogenetische Stammbaum wurde mit drei Methoden (Neighbour-joining Methode, Maximum Likelihood und Minimum-Evolution) bestätigt. Dabei bildet das Selbstisolat MW-C3 keinen Cluster mit einem der anderen ermittelten Arten.

Deshalb wurde ebenfalls über die Datenbank des Ribosomal Database Projects ein Abgleich der Sequenz zu den in den Datenbanken vorhandenen kultivierten Stämmen durchgeführt. Die Ergebnisse sind ebenfalls im Anhang (Tabelle 10.4) aufgelistet. Hierbei wurden Stämme gefunden, die eine nähere verwandtschaftliche Beziehung zu MW-C3 aufweisen. Diese vier Stämme wurden allerdings keiner Gattung oder Art zugeordnet und werden daher nur als Mitglied der Familie *Flavobacteriaceae* geführt. Die höchste Sequenzübereinstimmung besaß der Stamm CZ1127 (96,92 %), gefolgt von Stamm SA-0082 (96,50 %), Stamm KLE1008 (95,78 %) und HDJ3 (95,45 %). Von diesen verwandten Stämmen wurde ebenso ein



63

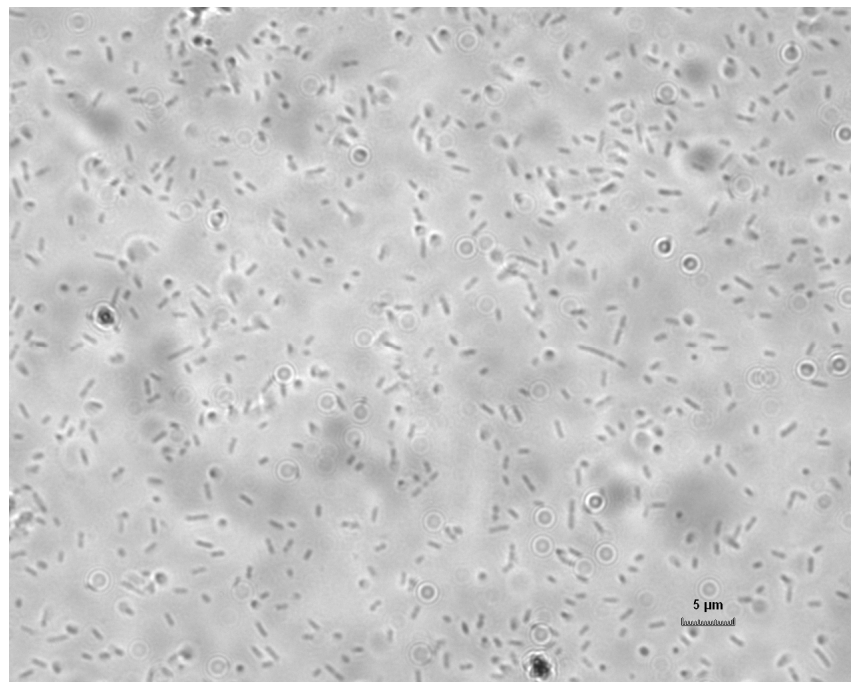
### 3.3.2 Phänotypische und biochemische Charakterisierung

Für die Einordnung des Selbstisolats MW-C3 wurden zahlreiche phänotypische und biochemische Tests durchgeführt. Ein Überblick über phänotypische Studien ist in Tabelle 3.7 wiedergegeben. Herausstechende Merkmale dabei sind die besonders kleine Koloniegröße und die orangene Pigmentierung des Bakteriums, welche nicht aus Flexirubin-Pigmenten besteht.

**Tabelle 3.7: Übersicht einiger phänotypischer Eigenschaften von MW-C3**

Test	Ergebnis	Test	Ergebnis
Bakteriengröße	1-3 $\mu\text{m}$	Wachstum	fakultativ anaerob
Bakterienform	stäbchenförmig	Oxidase	-
Gram-Färbung	-	Katalase	+
Temperatur	4-37 $^{\circ}\text{C}$	Koloniefarbe	weiß-transparent
pH	pH 5-9	Koloniegröße	< 1mm
NaCl %	1-9	Kolonieform	rund
ASW %	30-100	Flexirubin-Pigmente	-

Abbildung 3.10 zeigt eine mikroskopische Aufnahme der Bakterien.



**Abbildung 3.10: Mikroskopische Aufnahme von MW-C3 (200x Vergrößerung).**

In Tabelle 3.8 sind wichtige biochemische Eigenschaften des Mikroorganismus aufgelistet. Diese umfassen generell bekannte und häufig verwendete Tests, auf das Vorliegen von bestimmten Enzymen. Die untersuchten Merkmale werden häufig für den Vergleich von verschiedenen Stämmen herangezogen.



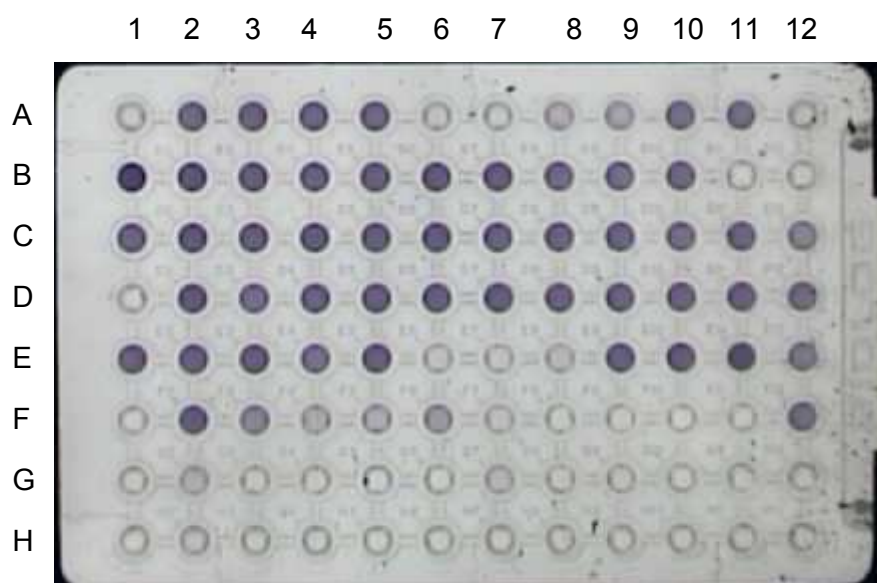
**Tabelle 3.8: Übersicht einiger biochemischer Eigenschaften ermittelt durch API Testsysteme.**

Auswertung: +: positiv, -: negativ, +/-: schwache Reaktion

Test	MW-C3
Alkalische Phosphatase	+
Leucin-Arylamidase	+
Valin-Arylamidase	+/-
Saure Phosphatase	+/-
$\beta$ -Galactosidase	+
$\alpha$ -Fucosidase	+
Nitratreduktion	-
Indolbildung aus Trp	-
Fermentation von Glc	-
Urease	-
$\beta$ -Glucosidase	+
Gelatineverflüssigung	-

**Biochemische Charakterisierung mittels Biolog®**

Die metabolische Untersuchung von Mikroorganismen oder Zellen kann erschwert werden, wenn die Substanz im Metabolismus verwendet werden kann, aber dies nicht zu Wachstum führt. Dieses Problem kann mit Biolog PhenotypeMicroArrays (PM) umgangen werden. Dabei wird die metabolische Umsetzung einer Substanz durch Bildung von Reduktionsäquivalenten  $\text{NADH}^+$  nachgewiesen. Da der in Lösung vorhandene Tetrazolium-Farbstoff durch Reduktion von hell-gelb zu blau-violett umschlägt (Abbildung 3.11), wird dadurch die metabolische Aktivität nachgewiesen.

**Abbildung 3.11: Abbildung der PM4-Platte nach 72 h Inkubation von MW-C3 im Omnilog® bei 25°C.**

Well A1: Negativ-Kontrolle, blau-violette Färbung: positive Verwertung des Inhaltsstoffes.

Die in den folgenden Tabellen ermittelten Bilder mit Überlagerungen aus Doppelbestimmungen sind im Anhang abgebildet. Die wichtigsten Parameter einer Kultivierung wie Kohlenstoff-, Stickstoff-, Schwefel- und Phosphorquelle wurden dabei untersucht.

Die Tabelle 3.9 listet die verwendeten Kohlenstoffquellen von MW-C3 auf.

**Tabelle 3.9: Wichtige verwertete Kohlenstoffquellen des Isolats MW-C3**

Kohlenstoffquelle	Kohlenstoffquelle	Kohlenstoffquelle
D-Glucose	D-Mannitol	2-Deoxy-D-Ribose
L-Fucose	N-Acetyl-D-Glucosamin	$\beta$ -Methyl-D-Xyloside
D-Xylose	$\alpha$ -D-Lactose	Dihydroxyaceton
Saccharose	D-Mannose	
D-Fructose	D-Galactose	

Der Stamm ist somit nur in der Lage, Zucker als Kohlenstoffquelle zu verwenden, jedoch keine Aminosäure oder andere organische Verbindungen mit der Ausnahme von Dihydroxyaceton.

Als weiteres wichtiges Element im Stoffwechsel eines Organismus findet sich der Stickstoff. Dies wurde durch PM3B-Platten untersucht. In der folgenden Tabelle findet sich die Übersicht über verwendete Stickstoffquellen (Tabelle 3.10).

**Tabelle 3.10: Wichtige verwertete Stickstoffquellen des Isolats MW-C3**

Stickstoffquelle	Stickstoffquelle
Ammonium	Ala-Gln
Nitrat	Gly-Asn
L-Asparagin	Gly-Gln
L-Aspartat	L-Glutamin
L-Glutamat	N-Acetyl-D-Glucosamin

Die Aminosäuren L-Asparagin (Asn), L-Aspartat (Asp), L-Glutamin (Gln) und L-Glutamat (Glu) dienen zwar nicht als Kohlenstoffquelle, dafür jedoch als Stickstoffquelle. Ebenso kann N-Acetyl-D-Glucosamin verwendet werden. Die anorganischen Ionen Ammonium und Nitrat werden ebenfalls genutzt, jedoch erfolgt keine Verwertung von Nitrit.

Eine Übersicht der verwendeten Phosphatquellen ist in Tabelle 3.11 aufgelistet.

**Tabelle 3.11: Wichtige verwertete Phosphatquellen des Isolats MW-C3**

Phosphatquelle	Phosphatquelle
Phosphat	D,L- $\alpha$ -Glycerinphosphat
Pyrophosphat	beta-Glycerinphosphat
Trimetaphosphat	Carbamylphosphat
Adenosin-5'-monophosphat	D-2-Phospho-glycerinsäure
Adenosin-2',3'-cycl.-monophosphat	D-3-Phospho-glycerinsäure
Thiophosphat	Guanosin-2'-monophosphat
Dithiophosphat	Guanosin-3'-monophosphat
Phosphoenolpyruvat	Guanosin-5'-monophosphat
Phospho-glycolic acid	6-Phosphugluconicacid
D-Glucose-1'-phosphat	Cytidine-2'-monophosphat
D-Glucose-6'-phosphat	Cytidine-3'-monophosphat
2-Deoxy-D-Glucose6-phosphat	Cytidine-5'-monophosphat
D-Glucosamine-6-phosphat	Cytidine-2',3'-cycl.-monophosphat
D-Mannose-6-phosphat	O-Phospho-L-Serin
Phospho-L-Arginin	O-Phospho-L-Threonin
O-Phospho-D-Serin	Uridin-2'-monophosphat
Uridin-3'-monophosphat	Uridin-2',3'-cycl.-monophosphat
Uridin-5'-monophosphat	Uridin-3',5'-cycl.-monophosphat
O-Phospho-D-Tyrosine	Phosphoryl Cholin
O-Phospho-L-Tyrosine	O-Phosphoryl-Ethanolamine
Phosphocreatine	Thymidine-3'-monophosphat
Thymidin-5'-monophosphat	Thymidine-3',5'-cycl.-monophosphat
Inositol Hexaphosphat	

Die Breite der verwendeten Phosphatverbindungen reicht von anorganischem Phosphat bis zu mehrfach phosphatierten organischen Verbindungen.

Zusätzlich wurden die Sulfatquellen als Wachstoffsstoff untersucht (Tabelle 3.12). Das Bakterium kann nur Sulfat, Thiosulfat und L-Cystein-Sulfinsäure verwerten.

**Tabelle 3.12: Wichtigste verwertete Sulfatquellen des Isolats MW-C3**

Sulfatquelle
Sulfat
Thiosulfat
L-Cystein-Sulfinsäure

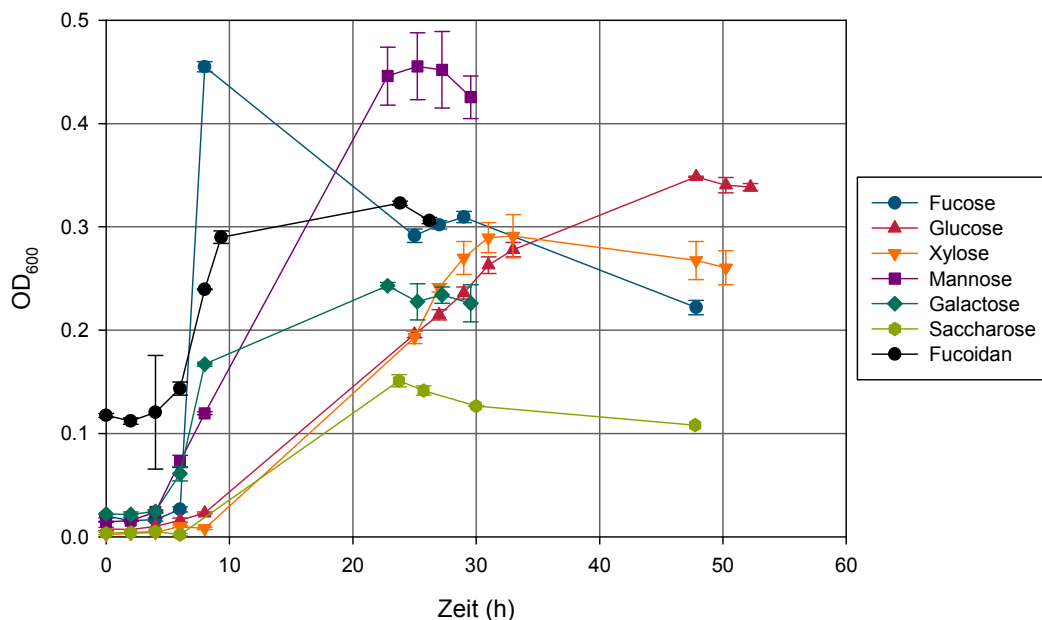
## Zusammenfassung

Für die Bestimmung des Isolats MW-C3 wurde die 16S rDNA des Stammes sequenziert. Der Organismus wurde der Familie der *Flavobacteriaceae* zugeordnet, jedoch waren die Sequenzidentitäten zu beschriebenen Gattungen zu gering, um MW-C3 genauer einzuordnen. Zusätzlich wurden phänotypische und biochemische Untersuchungen durchgeführt. Herausstechendstes Merkmal ist die geringe Vielfalt an genutzten Kohlenstoffquellen, da das Isolat hauptsächlich Monosaccharide bzw. Disaccharide verwertet.

### 3.4 Wachstum und Fucoidanase-Aktivität des marinen Isolats MW-C3

#### 3.4.1 Studien zum Wachstum von MW-C3

Da das zu den *Flavobacteriaceae* gehörende Bakterium MW-C3 vergleichsweise geringes Wachstum im Medium, basierend auf künstlichem Meerwasser, zeigte, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden die in Fucoidan vorhandenen Monosaccharide sowie Saccharose als **Kohlenstoffquellen** eingesetzt und das Bakterium bei Isolierungstemperatur (25 °C) kultiviert. Die Variation der genutzten Kohlenstoffquelle ist in Abbildung 3.12 zu erkennen. Als Vergleich wurde die Kultivierung von MW-C3 auf ASW + Fucoidan (5 g/l) eingefügt.



**Abbildung 3.12: Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Wachstum des Selbstisolats MW-C3 in künstlichem Meerwasser.**

Bedingungen: 20 ml Schüttelkulturen; ASW-Medium: Kohlenstoffquelle (jeweils 5 g/l), Natriumnitrat (0,549 mM), Anfangs-pH: 7,4, 25 °C, 150 rpm.

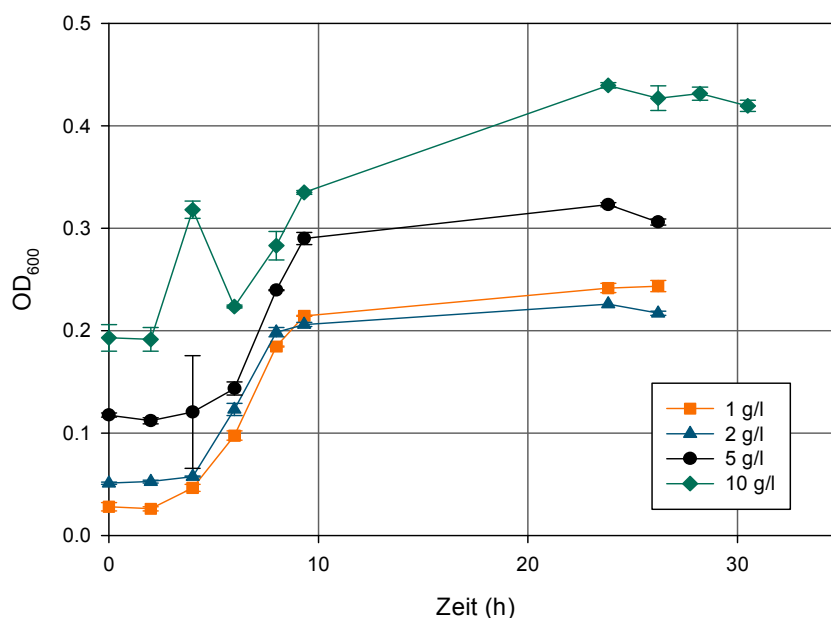
Man erkennt, dass das Selbstisolat MW-C3 in der Lage ist, alle getesteten Zucker als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Es kann eine anfängliche lag-Phase beobachtet werden, die etwa 4-6 Stunden andauert. Das Wachstum auf Fucoidan als einziger Kohlenstoffquelle führt zu einer maximalen OD<sub>600</sub> von ca. 0,300. Dieser maximale Wert wird übertroffen bei einer Kultivierung auf Fucose, Mannose und Glucose. Interessant ist hierbei das sehr schnelle Wachstum auf Fucose; das gemessene Maximum der OD<sub>600</sub> (0,455) wird bereits nach 8 Stunden erreicht. Der gleiche Wert (OD<sub>600</sub> = 0,455) wird für Mannose erhalten, allerdings erst

nach 20 Stunden. Bei Wachstum auf Glucose wird der Wert der maximalen  $OD_{600}$  von 0,348 erst nach ca. 48 Stunden gemessen.

Vergleicht man die Verläufe der Wachstumskurven, so ähnelt die Kurve von Fucose sehr stark dem Wachstum auf Fucoidan. Bei beiden Kultivierungen wird die stationäre Phase bereits nach 8 Stunden erreicht.

Obwohl, wie gezeigt, Glucose als C-Quelle nicht ganz so gut geeignet erscheint, wie andere Monosaccharide, wurde sie bei den meisten der folgenden Untersuchungen aus Kostengründen bevorzugt eingesetzt. Die Preise für Mannose und Fucose sind um ein Vielfaches höher (300-fach bis 2000-fach).

Variiert man die **Konzentration des Fucoidans** (siehe Abbildung 3.13), ergibt sich keine Änderung im Hinblick auf die Differenz der  $OD_{600}$ -Werte vom Beginn der Kultivierung bis zum jeweils maximal erreichten  $OD_{600}$ -Wert. Da das Medium bereits eine starke Eigentrübung aufweist, wird hierdurch der Anfangswert der  $OD_{600}$  erhöht, jedoch führt eine höhere Fucoidankonzentration nicht zu einem höheren  $OD_{600}$ -Wert. Die Zunahme der optischen Dichte liegt im Bereich von 0,175 – 0,246 (Fucoidankonzentration 2 – 10 g/l).



**Abbildung 3.13: Einfluss der Fucoidankonzentration auf das Wachstum von MW-C3.**

Bedingungen: 20 ml Schüttelkulturen; ASW-Medium: Fucoidan (1-10 g/l), Natriumnitrat (0,549 mM); Anfangs-pH: 7,4; 25 °C, 150 rpm.

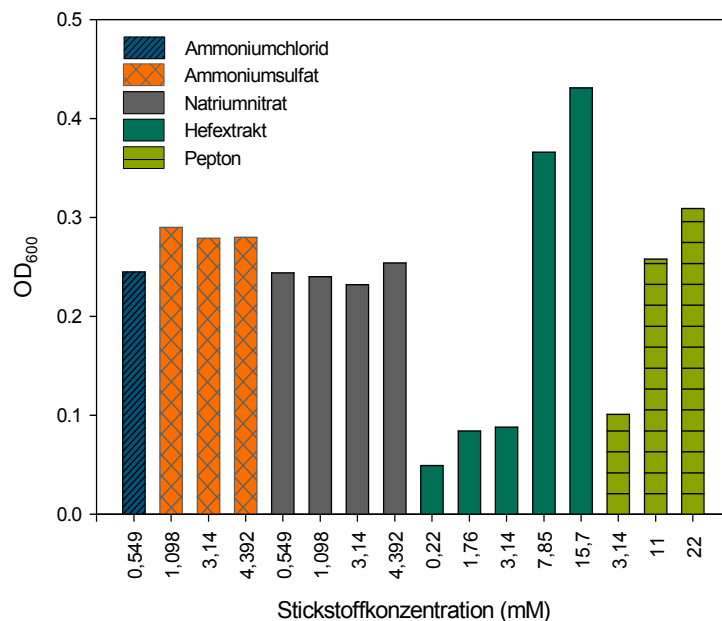
Da in dieser Arbeit selbstextrahiertes Fucoidan aus der Alge *Fucus vesiculosus* verwendet wurde und es als Naturprodukt Schwankungen unterliegen kann, wurde Fucoidan zu

Vergleichszwecken von Sigma-Aldrich (ebenfalls von *Fucus vesiculosus*) bezogen und alternativ als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Zusätzlich wurde aus Algenpulver der Alge *Laminaria digitata* Fucoïdan extrahiert und dieses als C-Quelle dem Medium zugefügt. Wie in Tabelle 3.13 zu sehen ist, kann MW-C3 auch das Fucoïdan von Sigma-Aldrich als Kohlenstoffquelle verwerten, jedoch nicht das Fucoïdan von *Laminaria digitata*.

**Tabelle 3.13: Untersuchte Fucoïdane als Kohlenstoffquelle für MW-C3.**

<b>Fucoïdan aus</b>	<b>Wachstum</b>
<i>Fucus vesiculosus</i>	+
<i>Fucus vesiculosus</i> (Sigma)	+
<i>Laminaria digitata</i>	-

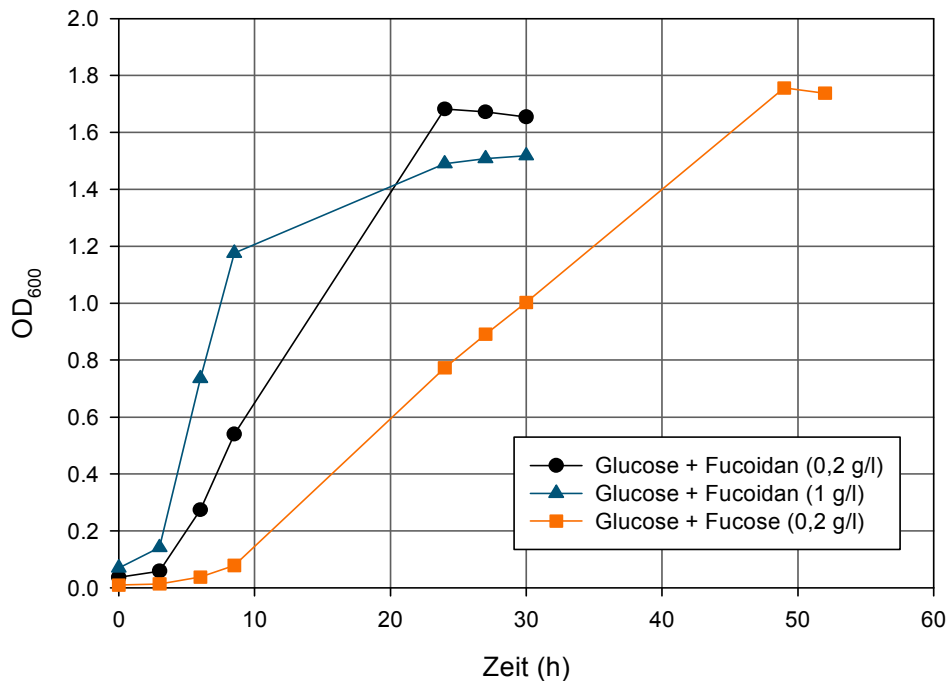
Als weiterer Parameter für die Optimierung des Wachstums wurden verschiedene **Stickstoffquellen** untersucht. Es wurden sowohl anorganische als auch organische Stickstoffquellen eingesetzt. Die Abbildung 3.14 zeigt die maximal erreichten Werte für die OD<sub>600</sub>, die bei Wachstum auf Glucose erreicht wurden. Hierbei ist die molare Konzentration bezogen auf den Stickstoffgehalt innerhalb der Substanzen. Es zeigt sich deutlich, dass bei anorganischen Stickstoffquellen durch Erhöhung der Stickstoffkonzentration kein verbessertes Wachstum erreicht wird. Nur bei sehr hohen Konzentrationen von Hefeextrakt wird eine höhere OD<sub>600</sub> von 0,431 gemessen. Wie im späteren Kapitel 3.4.2 gezeigt, kann keine Fucoïdanase-Aktivität bei Kultivierung auf Hefeextrakt nachgewiesen werden. Daher wird im Folgenden eine anorganische Stickstoffquelle gewählt.



**Abbildung 3.14: Einfluss verschiedener Stickstoffquellen auf die maximal erreichten OD<sub>600</sub>-Werte bei Kultivierung von MW-C3.**

Bedingungen: 20 ml Schüttelkulturen; ASW-Medium: Glucose (5 g/l); Anfangs-pH: 7,4, 25 °C, 150 rpm.

Da allgemein angenommen wird, dass der Zusatz von Fucoidan oder Fucose als Hauptbestandteil des Fucoidans förderlich für die Produktion einer Fucoidanase ist, wurden mehrere Varianten der **Kultivierungen mit Co-Substraten** untersucht (Abbildung 3.15). Hierbei erkennt man, dass die Kultivierung mit Glucose und Fucoidan (1g/l) anfänglich ein schnelleres Wachstum zeigte. Jedoch ist die maximal erreichte optische Dichte bei der Zugabe von nur 0,2 g/l Fucoidan zu Glucose etwas höher. Zusätzlich ist der OD<sub>600</sub>-Wert des Organismus auf Glucose und Fucose am höchsten; der Wert wird allerdings erst nach ca. 50 h erreicht.



**Abbildung 3.15: Co-Kultivierungen von MW-C3 auf Glucose (5g/l) mit Fucoidan oder Fucose als Co-Substrat.**

Bedingungen: 20 ml Schüttelkulturen; ASW-Medium: Glucose (5g/l) + Fucose oder Fucoidan; Ammoniumsulfat (1,57 mM); 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0); 25 °C, 150 rpm.

Die leicht unterschiedlichen Kultivierungsergebnisse mit den Glucose/Fucoidan-Kombinationen sind nicht vollständig verständlich, da der Ansatz mit einem höheren Gesamtzuckergehalt (Glucose 5g/l und Fucoidan 1g/l) eine geringere optische Dichte erzielte als die Kultivierung mit zugesetzten Fucoidananteil von nur 0,2 g/l. Dies ist teilweise darauf zurückzuführen, dass die Glucose nicht vollständig verbraucht wurde. Da die Bestimmung der Fucoidankonzentration während der Kultivierung nicht möglich war, kann daher nicht komplett erklärt werden, wodurch der Unterschied hervorgerufen wurde. In Tabelle 3.14 sind die gemessenen Zuckerkonzentrationen während der Kultivierung mit Co-Substraten aufgelistet. Die Kultivierung auf Glucose kombiniert mit Fucose hat zum höchsten Abbau an Zucker (44,5 %) geführt, was die höchste optische Dichte erklären würde. Die Kultivierungen mit zusätzlichem Fucoidan haben kaum Einfluss auf den Verbrauch von Glucose.

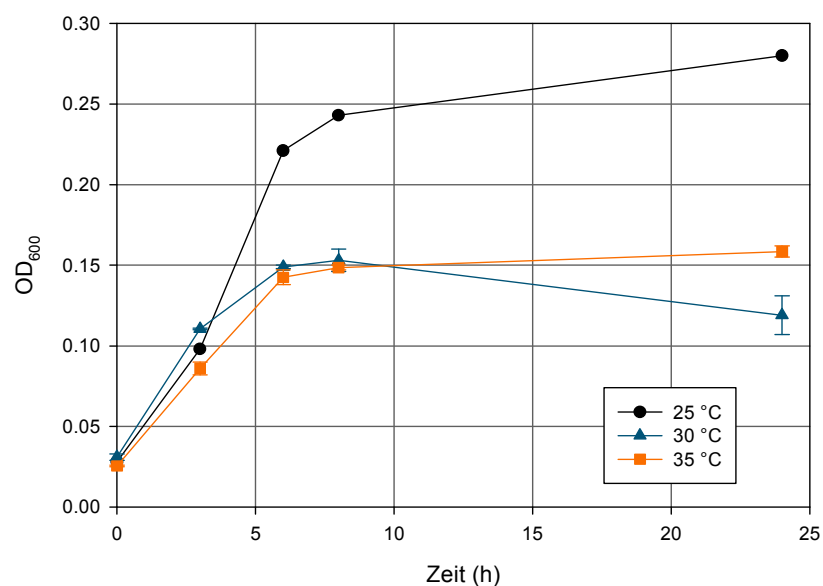


**Tabelle 3.14: Numerische Auswertung der Co-Kultivierung von MW-C3.**

Abgebauter Zucker ausgehend von der tatsächlich gemessenen Zuckerkonzentration bei Beginn der Kultivierung.

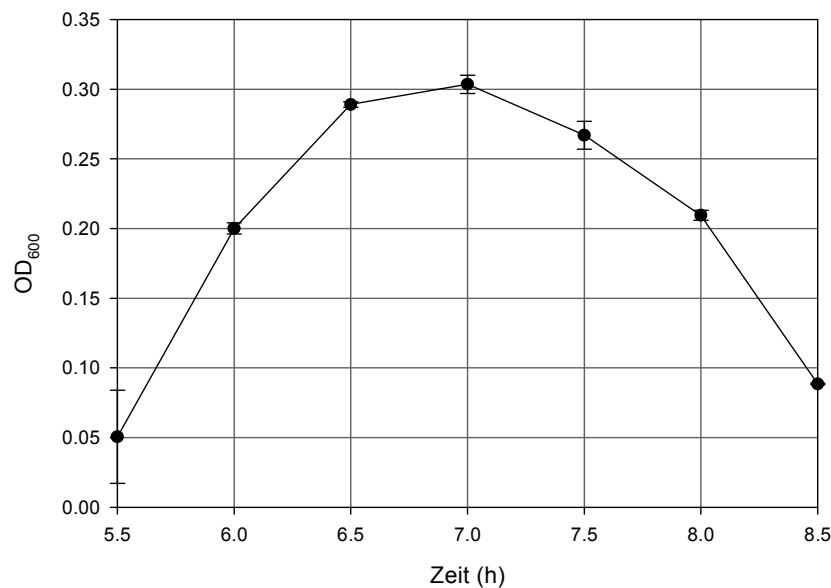
Zucker	Konzentration (g/l)	max. OD <sub>600</sub>	abgebauter Zucker (g/l)	abgebauter Zucker (%)
Glucose	5	1,032	1,73	35,5
Glucose	5	1,756	2,25	44,5
Fucose	0,2			
Glucose	5	1,682	1,24	27,3
Fucoidan	0,2			
Glucose	5	1,518	1,29	28,0
Fucoidan	1			

Als weiterer Kultivierungsparameter für die Optimierung des Wachstums wurde die **Temperatur** untersucht. In Abbildung 3.16 ist das Wachstum abhängig von der Temperatur dargestellt. In den ersten 4 Stunden verläuft die Wachstumskurve für alle Temperaturen ähnlich. Bereits nach 6 Stunden ist deutlich zu sehen, dass die OD<sub>600</sub>-Werte bei 30 °C und 35 °C stagnieren und um 0,1-Einheiten niedriger bleiben als bei 25 °C.

**Abbildung 3.16: Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von MW-C3.**

Bedingungen: 20 ml Schüttelkultur; ASW-Medium: Glucose (5g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM); 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0); 25°C, 150 rpm.

Die **Bestimmung der pH-Abhängigkeit** des Wachstums wurde mit verschiedenen Puffersystemen untersucht (Abbildung 3.17). Exemplarisch ist die optische Dichte OD<sub>600</sub> nach 24 Stunden Wachstum abhängig von dem pH-Wert dargestellt. Das pH-Optimum kann bei Werten von pH 6,5 bis 7,5 erkannt werden.



**Abbildung 3.17: Einfluss des pH-Werts auf das Wachstum von MW-C3.**

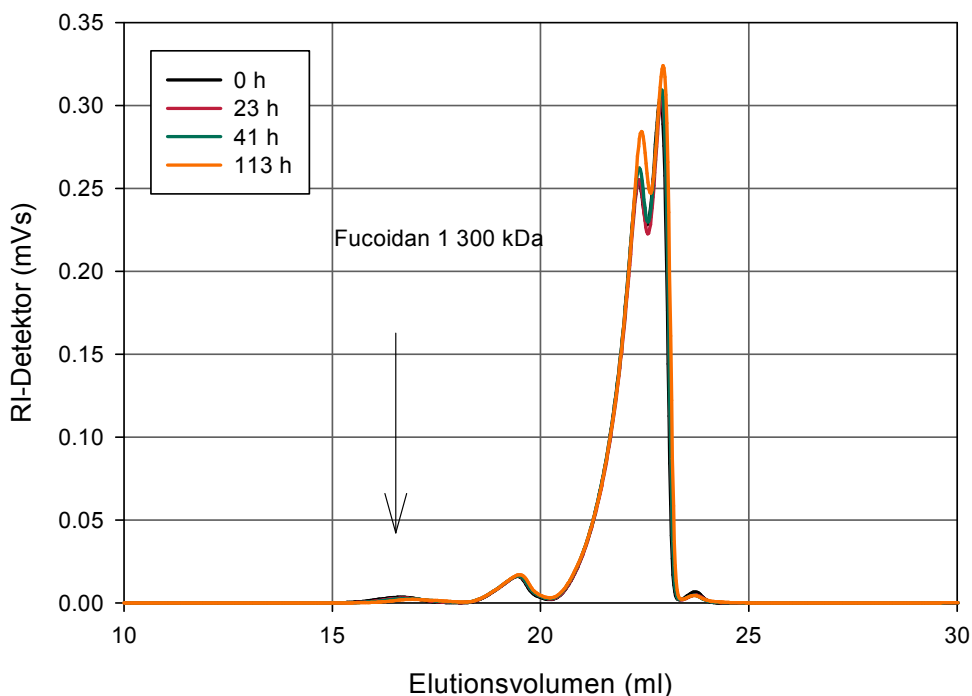
Bedingungen: 20 ml Schüttelkulturen; ASW- Medium: Glucose (5 g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM), mit verschiedenen Puffern (je 50 mM); 25 °C, 150 rpm.

### 3.4.2 Charakterisierung der Fucoidanaseaktivität

Im vorangehenden Kapitel wurde gezeigt, dass aus marinen Proben (Algen, Sand, Meerwasser), die an der Nordsee gezogen wurden, das marine Bakterium MW-C3 isoliert werden konnte, das auf Fucoidan als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann. Daher kann angenommen werden, dass das Bakterium hydrolytische Enzyme produziert, die Fucoidan spalten können. Diese Fucoidanase-Aktivität soll in diesem Kapitel näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene analytische Methoden ausgewertet. Die bereits in anderen Arbeiten mit Fucoidan eingesetzten Methoden waren die Kohlenhydrat-Polyacrylamidgelelektrophorese (C-PAGE) und die Gelpermeationschromatographie (GPC) (Chang *et al.*, 2010; Descamps *et al.*, 2006).

**Evaluierung der analytischen Methoden.** Aus arbeitstechnischen Gründen (geringerer Aufwand) wurde zur Evaluierung nur die extrazelluläre Aktivität des Isolats MW-C3 untersucht. In Abbildung 3.18 sind die Elugramme eines Enzymaktivitätstests mithilfe der **GPC und einem RI-Detektor** dargestellt worden. Für den Fucoidanassay wurde der Kulturüberstand durch Zentrifugation gewonnen und als Enzymlösung eingesetzt. Die Dauer des Tests betrug 113 Stunden, mit definierten Probezeitpunkten. Sehr deutlich ist der Salz- und Proteinpeak zwischen ca. 21 - 23 Minuten zu erkennen. Ein Peak mit einer geringeren

Höhe ist im Bereich von 19 Minuten zu beobachten, der unter anderem Abbauprodukte des Fucoidans enthält. Zusätzlich befindet sich ein sehr geringer Peak im Bereich von 16 Minuten, der das hochmolekulare Fucoidan darstellt.



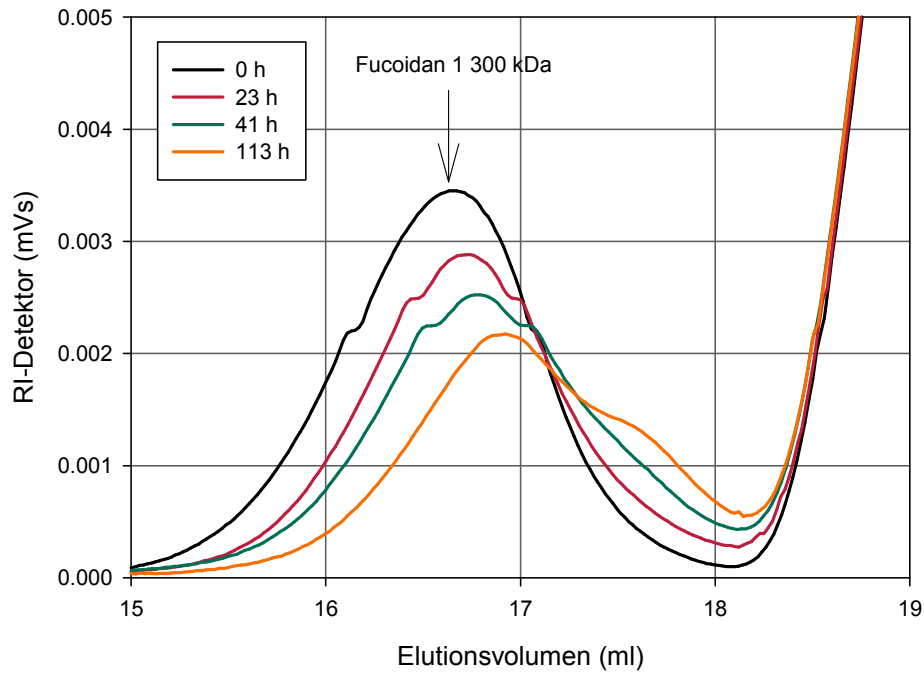
**Abbildung 3.18: Elugramm (RI-Detektor) der enzymatischen Umsetzung von Fucoidan aus *Fucus vesiculosus* für die Stunden 0-113.**

Bedingungen: 20 ml Schüttelkultur; ASW-Medium: Fucoidan (1 g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM); Anfangs-pH 7,4, 25 °C, 150 rpm; Enzymaktivitätstest: 300 µl Enzymlösung + 100 µl Substrat bei 25 °C; Elutionsvolumen 16-18 ml: hochmolekulares Fucoidan, Elutionsvolumen 20-23 ml: Protein und Salze zusätzlich evtl. Fucoidanabbauprodukte.

Im Vergleich zu den zwei weiteren im Elugramm vorhandenen Peaks ist der Peak mit dem Fucoidan sehr schlecht zu erkennen. Deshalb ist in Abbildung 3.19 ein vergrößerter Ausschnitt des Elutionsprofils zwischen 15 und 19 ml gezeigt. Hier sieht man, dass die Peaks graduell abnehmen und sich das Peakmaximum zu zunehmendem Elutionsvolumina zu den späteren Probenzeitpunkten verschiebt.

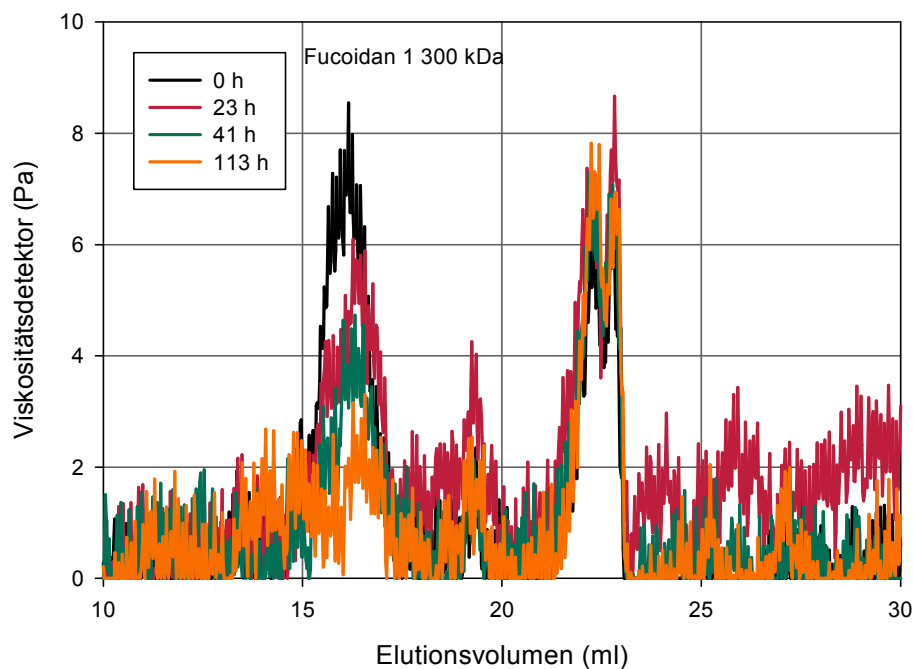
Ein zeitgleich an die **GPC angeschlossener Viskositätsdetektor** zeigt in Abbildung 3.20 die Messung der Druckdifferenz innerhalb einer Messbrücke, durch welche die intrinsische Viskosität der Probe bestimmt wird.

Vergleichbar mit dem vergrößerten Ausschnitt des RI-Detektorsignals ist auch im Elugramm des Viskositätsdetektors die Abnahme der Peakhöhe und ansatzweise die Verschiebung der Elutionsvolumina mit zunehmender Zeit des Enzymaktivitätstest erkennbar. Im Gegensatz zu dem Elugramm des RI-Detektor ist hier allerdings keine höhere Auflösung nötig, um den Peak des Fucoidans zu erkennen.



**Abbildung 3.19: Ausschnitt des Fucoidanpeaks aus dem Elugramm (RI-Detektor) der enzymatischen Umsetzung von Fucoidan aus *Fucus vesiculosus*.**

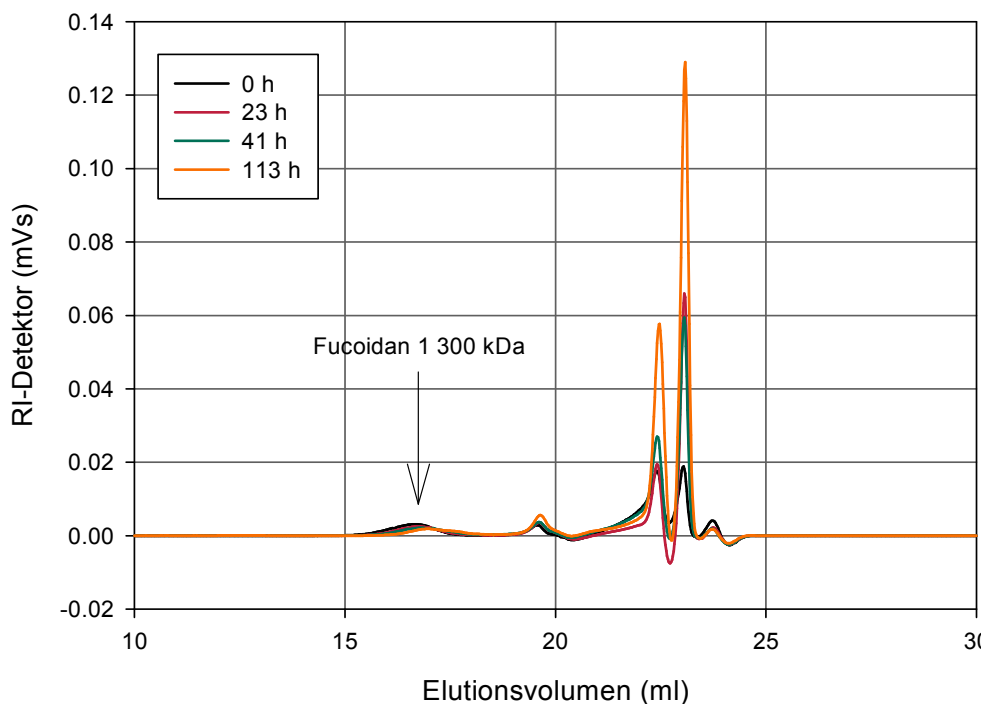
Bedingungen: 20 ml Schüttelkultur; ASW-Medium: Fucoidan (1 g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM); Anfangs-pH 7,4, 25 °C, 150 rpm; Enzymaktivitätstest: 300 µl Enzymlösung + 100 µl Substrat bei 25 °C; Elutionsvolumen 16-18 ml: hochmolekulares Fucoidan.



**Abbildung 3.20: Elugramm (Viskositätsdetektor) der enzymatischen Umsetzung von Fucoidan aus *Fucus vesiculosus* für die Stunden 0-113.**

Bedingungen: 20 ml Schüttelkultur; ASW-Medium: Fucoidan (1 g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM); Anfangs-pH 7,4, 25 °C, 150 rpm; Enzymaktivitätstest: 300 µl Enzymlösung + 100 µl Substrat bei 25 °C; Elutionsvolumen 16-18 ml: hochmolekulares Fucoidan, Elutionsvolumen 20-23 ml: Protein und Salze zusätzlich evtl. Fucoidanabbauprodukte.

In Abbildung 3.21 ist das Elugramm des RI-Detektors dargestellt, nachdem die ebenfalls vermessene Enzymlösung (Kulturüberstand) von den Daten des Enzymaktivitätstests subtrahiert wurde. Dies diente der deutlicheren Darstellung der entstandenen Produkte aus dem eingesetzten Fucoïdan, da Messsignale des RI-Detektors, die durch die Enzymlösung entstanden, nicht im Elugramm erscheinen.

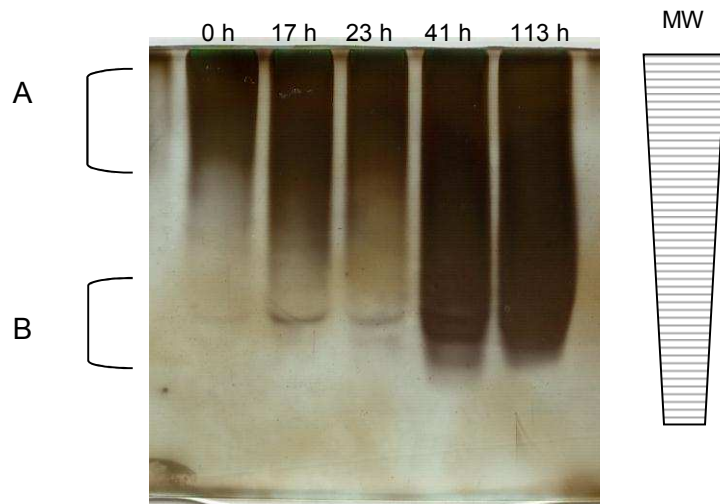


**Abbildung 3.21: Elugramm des Enzymaktivitätstests mit subtrahierten Peakdaten der eingesetzten Enzymlösung.**

Bedingungen: 20 ml Schüttelkultur; ASW-Medium: Fucoïdan (1 g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM); Anfangs-pH 7,4, 25 °C, 150 rpm; Enzymaktivitätstest: 300 µl Enzymlösung + 100 µl Substrat bei 25 °C; Elutionsvolumen 16-18 ml: hochmolekulares Fucoïdan, Elutionsvolumen 20-23 ml: evtl. Fucoïdanabbauprodukte.

Durch die Bearbeitung der Daten sind die Peakflächen der späteren Elutionsvolumina (22 – 24 ml) kleiner. Zudem ist die Zunahme der Peaks im Vergleich zu der nicht bearbeiteten Version wesentlich deutlicher zu erkennen.

Im Vergleich zu den Messergebnissen der GPC ist in Abbildung 3.22 die zeitliche Abhängigkeit der Enzymaktivität mithilfe der **Carbohydrate-PAGE** dargestellt. Die Proben entsprechen denen, die mithilfe der GPC vermessen wurden. Die Nullstundenprobe ist dabei unverdautes Fucoïdan, das ein Molekulargewicht von ca. 1 MDa entspricht. Die Färbung zeigt bereits bei der Nullstundenprobe einen schwarzen Schmier im oberen Viertel des Gels. Mit zunehmender Testdauer verlängert sich der Schmier, bis er ungefähr dreiviertel des Gels lang ist. Diese Zunahme an Färbung im unteren Teil des Gels entspricht der Zunahme von Fucoïdanfragmenten mit geringerem Molekulargewicht.

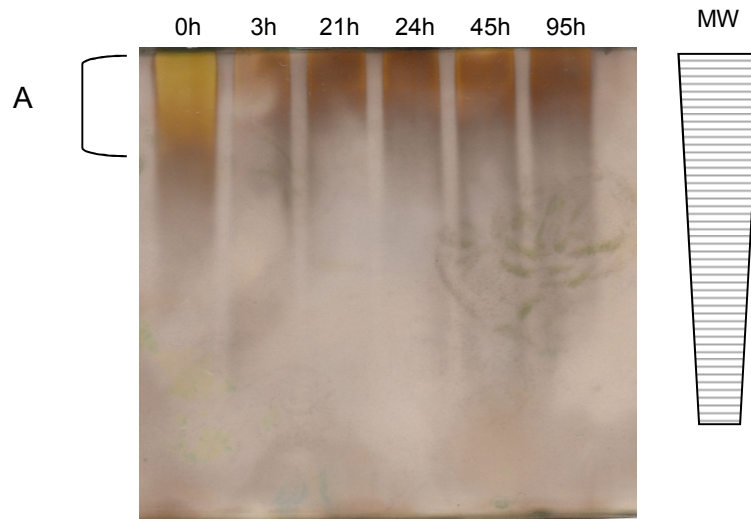


**Abbildung 3.22: C-PAGE der zeitlichen Abhängigkeit der Produktion von Oligosacchariden aus extrazellulärer Enzymlösung.**

Bedingungen: 20 ml Schüttelkultur; ASW-Medium: Fucoidan (1 g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM), Anfangs-pH: 7,4, 25 °C, 150 rpm; Enzymaktivitätstest: 300 µl Enzymlösung + 100 µl Substrat bei 25 °C; Bereich A hochmolekulares Fucoidan, Bereich B: Laufweite von Phenolrot; Zeitangaben über dem Gel geben die Zeitpunkte der Probenahme des Enzymaktivitätstests an.

Zwischen den Proben von 41 Stunden und 113 Stunden ist kein Unterschied zu erkennen, weshalb nachfolgend die Enzymaktivitätstests nach ca. 40 - 47 h beendet wurden.

Die intrazelluläre Enzymaktivität wurde ebenfalls getestet. Man kann der C-PAGE (Abbildung 3.23) nicht entnehmen, dass ein Polymerabbau stattgefunden hat. Daher wurde dies nicht weiter verfolgt.

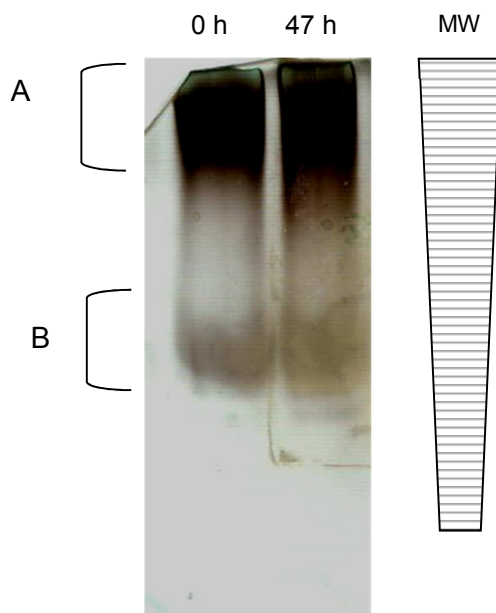


**Abbildung 3.23: C-PAGE der zeitlichen Abhängigkeit der Produktion von Oligosacchariden aus intrazellulärer Enzymlösung.**

Bedingungen: 20 ml Schüttelkultur; ASW-Medium: Fucoidan (1 g/l), Natriumnitrat (1,57 mM), Anfangs-pH: 7,4, 25 °C, 150 rpm; Enzymaktivitätstest: 300 µl Enzymlösung + 100 µl Substrat bei 25 °C; Bereich A hochmolekulares Fucoidan, Bereich B: Laufweite von Phenolrot; Zeitangaben über dem Gel geben die Zeitpunkte der Probenahme des Enzymaktivitätstests an.

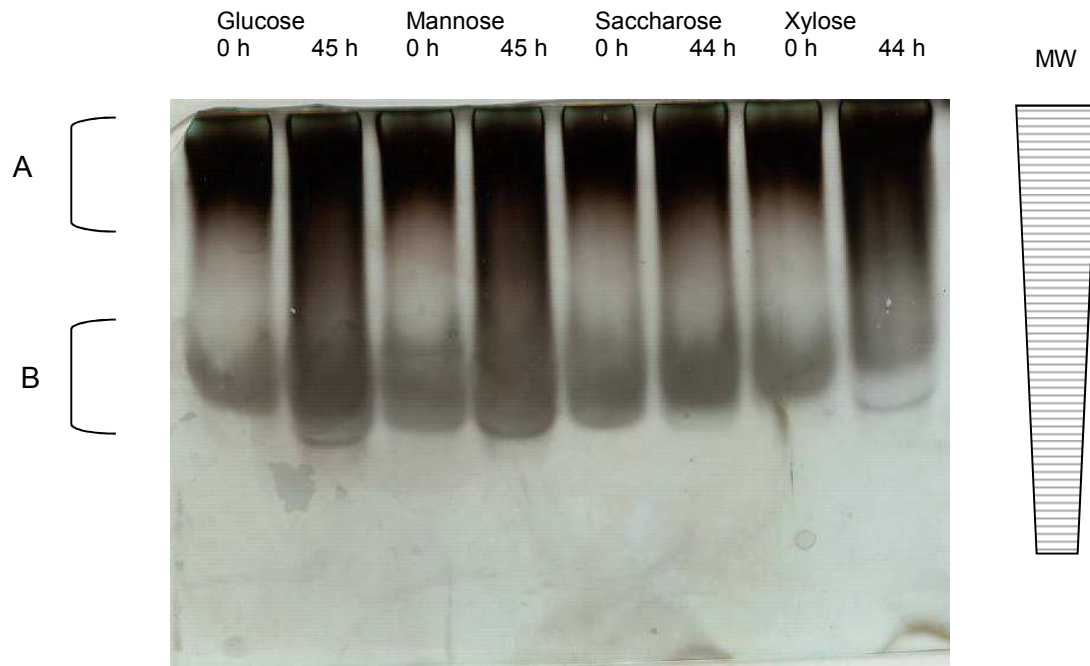
Da die Enzymaktivität nach Wachstum auf Fucoïdan nachweisbar war, wurden weitere Parameter getestet, um näher charakterisieren zu können, unter welchen Bedingungen Fucoïdanase-Aktivität vorhanden ist.

**Qualitative Untersuchungen zum Fucoïdanabbau.** Um den **Einfluss der Stickstoffquelle** zu untersuchen, wurde der Überstand einer Kultivierung auf Fucoïdan mit Hefeextrakt für die Messung der Enzymaktivität verwendet. Wie man anhand der Abbildung 3.24 erkennen kann, ließ sich keine Fucoïdanaseaktivität nachweisen. Daher wurden im Folgenden die Kultivierungen des Isolats MW-C3 bezüglich des Fucoïdanabbaus auf Nährmedium mit anorganischer Stickstoffquelle (siehe Abbildung 3.22) durchgeführt.



**Abbildung 3.24: C-PAGE des Enzymaktivitätstests nach Wachstum auf Fucoïdan und Hefeextrakt.** Bedingungen: 20 ml Schüttelkultur; ASW-Medium: Fucoïdan (1 g/l), Hefeextrakt (0,4 g/l) Anfangs-pH: 7,4, 25 °C, 150 rpm; Enzymaktivitätstest: 300 µl Enzymlösung + 100 µl Substrat bei 25 °C; Bereich A hochmolekulares Fucoïdan, Bereich B: Laufweite von Phenolrot; Zeitangaben über dem Gel geben die Zeitpunkte der Probenahme des Enzymaktivitätstests an.

Zusätzlich wurden verschiedene Kohlenstoffquellen in Hinblick auf ihre Auswirkungen auf die Enzymaktivität untersucht. Der Enzymaktivitätstest wurde nach 44 - 46 Stunden beendet und mittels der C-PAGE (Abbildung 3.25) exemplarisch ausgewertet. Sobald sich im Vergleich zu der Nullstundenprobe Banden im kleineren Molekulargewichtsbereich befanden, wurde der Test als positiv bewertet (Tabelle 3.15).



**Abbildung 3.25: C-PAGE des Enzymaktivitätstests von Glucose, Mannose, Saccharose und Xylose in der stationäre Phase des Wachstums.**

Bedingungen: 20 ml Schüttelkultur; ASW-Medium: Zucker (5 g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM), 0 mM MOPS-Puffer (pH 7,0); 25 °C, 150 rpm; Enzymaktivitätstest: 300 µl Enzymlösung + 100 µl Substrat bei 25 °C; Bereich A hochmolekulares Fucoidan, Bereich B: Laufweite von Phenolrot; Zeitangaben über dem Gel geben die Zeitpunkte der Probenahme des Enzymaktivitätstests an.

**Tabelle 3.15: Qualitative Bewertung der Fucoidanase-Aktivität von MW-C3-Kulturen in Abhängigkeit von der C-Quelle sowie der Kultivierungszeit.**

Bedingungen: 20 ml Schüttelkultur; ASW-Medium: Zucker (5 g/l) bzw. Fucoidan (1g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM), 0 mM MOPS-Puffer (pH 7,0); 25 °C, 150 rpm. Enzymaktivität (EA): + = positiv, - = negativ, n.u. = nicht untersucht.

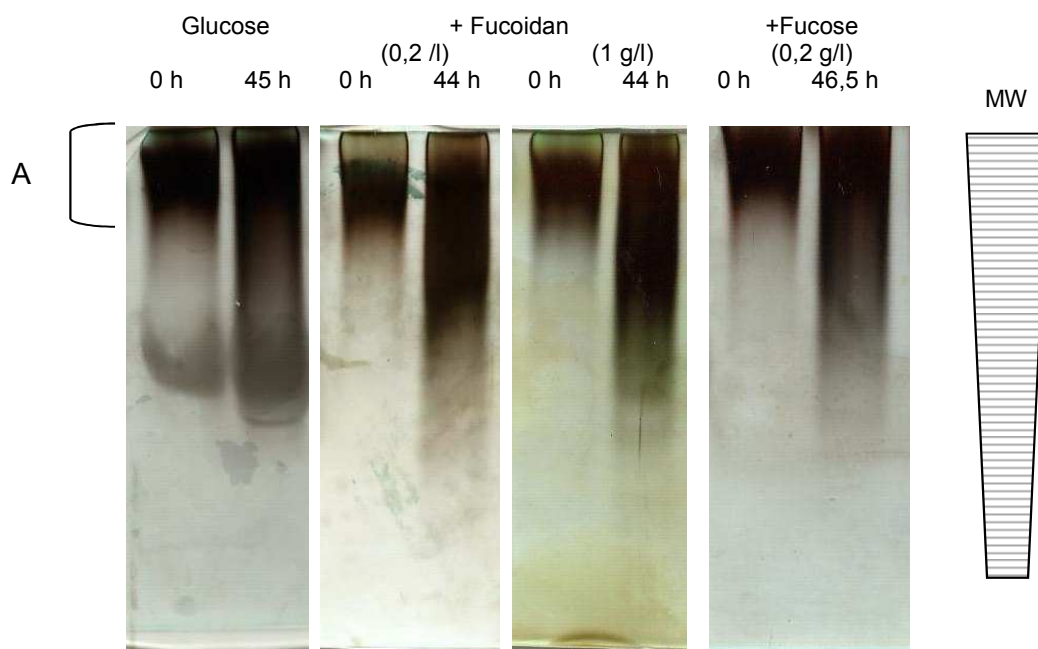
Phase	C-Quelle	Glc	Man	Fuc	Xyl	Gal	Sac	Fucoidan
<b>Anfang</b>	Zeit (h)	23,5	9	6	9	9	9	6
	OD <sub>600</sub>	0,614	0,159	0,017	0,110	0,183	0,146	0,221
	EA	+	+	+	+	+	-	+
<b>stationär</b>	Zeit (h)	50	50	28	30	30	30	27
	OD <sub>600</sub>	0,903	1,017	0,104	0,679	0,670	0,273	0,280
	EA	+	+	n.u.	+	+	-	n.u.

Hierbei ist sehr deutlich zu sehen, dass bei Wachstum auf Monosacchariden sowie Fucoidan sowohl in der anfänglichen Wachstumsphase als auch in der stationären Phase Enzymaktivität nachweisbar ist. Allein auf dem Disaccharid Saccharose kann keine Enzymaktivität während der Kultivierung erkannt werden. Die OD<sub>600</sub>-Werte in der stationären Phase erreichten bei diesen Versuchen maximale Werte von ca. 1,000 (Glucose, Mannose). Diese Werte entsprechen ungefähr einer Biotrockenmasse von 0,5 g/l.

Da bei den Kultivierungen mit Glucose und zusätzlich **Fucose oder Fucoidan als Co-Substrat** gutes Wachstum festgestellt wurde, wurde ebenfalls die Enzymaktivität nach



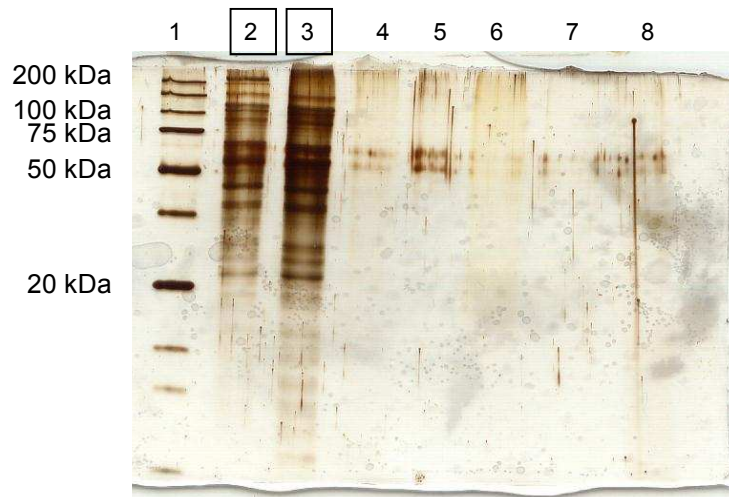
Wachstum auf diesen Substraten gemessen. Der C-PAGE (Abbildung 3.26) kann man entnehmen, dass Enzymaktivität bei allen Kultivierungen vorhanden war. Jedoch war die Färbung der niedermolekularen Polymerabbauprodukte am intensivsten bei den Kultivierungen von Glucose mit Fucoidan (0,2 und 1 g/l).



**Abbildung 3.26: C-PAGE des Enzymaktivitätstests Glucose + Co-Substrate.**

Bedingungen: 20 ml Schüttelkulturen; ASW-Medium: Glucose (5 g/l) ohne oder mit Fucose (0,2 g/l) bzw. Fucoidan (0,2 g/l oder 1 g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM); 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0), 25 °C, 150 rpm; Enzymaktivitätstest: 300 µl Enzymlösung + 100 µl Substrat bei 25 °C; Bereich A: hochmolekulares Fucoidan, Bereich B: Laufweite von Phenolrot; Zeitangaben über dem Gel geben die Zeitpunkte der Probenahme des Enzymaktivitätstests an.

**Aufkonzentrierung des Kulturüberstandes.** Es wurde zusätzlich versucht, das betreffende Protein bzw. Proteine, die für den Fucoidanabbau verantwortlich sind, durch eine gelelektrophoretische Auftrennung darzustellen. Hierzu wurde nach einer Schüttelkolbenkultivierung eine Zentrifugation vorgenommen und anschließend der Überstand mit Ammoniumsulfat gefällt. Es wurden verschiedene Konzentrationen an Ammoniumsulfat (40 %, 60 % und 80 %) getestet und anschließend von den Proteinfractionen nach Resuspension in künstlichem Meerwasser die Enzymaktivität bestimmt. In Abbildung 3.27 ist eine SDS-PAGE gezeigt mit den Fraktionen der Anreicherung.



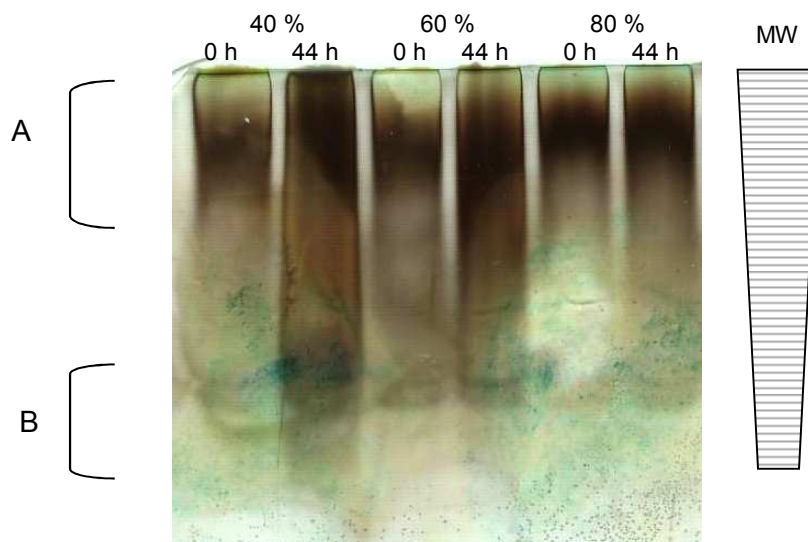
**Abbildung 3.27: SDS-PAGE bzgl. der Proteine aus Kulturüberständen (Schüttelkolben) mit und ohne Nachbehandlung.**

Spur 1: Marker; Spuren 2-4: Nachbehandlungen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  –Fällungen; Bedingungen: 50 ml Schüttelkultur; ASW-Medium: Glucose (5 g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM); Spur 2: 40 % (w/v), Spur 3: 60 % (w/v), Spur 4: 80% (w/v).

Spuren 5-7: Kulturüberstände; Bedingungen: 50 ml Schüttelkultur; ASW-Medium: 25 °C, 150 rpm; Spur 5: Glucose (5 g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM); Spur 6: Fucose (5 g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM); Spur 7: Glucose (5 g/l), Hefeextrakt (0,4 g/l).

In den beiden ersten Spuren können eine Vielzahl an Banden erkannt werden. Jedoch ist zwischen den Proteinbanden der Ammoniumsulfatfällung bei 40 % und 60 % kein Unterschied erkennbar. Im Vergleich dazu sind in der Spur der Ammoniumsulfatfällung bei 80 % nur zwei Banden zu sehen, die zwischen 75 kDa und 100 kDa liegen. Diese sind zusätzlich bei den Überständen der Kultivierungen (Spuren 4 bis 8) vorhanden.

Die zu den Fraktionen zugehörigen qualitativen Enzymaktivitätstests sind in Abbildung 3.28 abgebildet.



**Abbildung 3.28: C-PAGE des Enzymaktivitätstests, Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung (40% - 80%).**

Nachbehandlungen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  –Fällungen; Bedingungen: 50 ml Schüttelkultur; ASW-Medium: Glucose (5 g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM); Enzymaktivitätstest: 300  $\mu\text{l}$  Enzymlösung + 100  $\mu\text{l}$  Substrat bei 25 °C; Bereich A: hochmolekulares Fucoidan, Bereich B: Laufweite von Phenolrot. Zeitangaben über dem Gel geben die Zeitpunkte der Probenahme des Enzymaktivitätstests an.

Für die Fraktionen der 40 %- und 60 %-Ammoniumsulfatfällung kann eine Enzymaktivität nachgewiesen werden, für die Fraktion der 80 %-Ammoniumsulfatfällung jedoch nicht. So kann angenommen werden, dass die Proteinbanden im Bereich von 75-100 kDa, die sowohl in der Ammoniumsulfatfällung bei 80 % als auch bei den nicht aufkonzentrierten Kulturüberständen sichtbar waren, nicht für die Fucoidanaseaktivität verantwortlich sind.

### **Zusammenfassung**

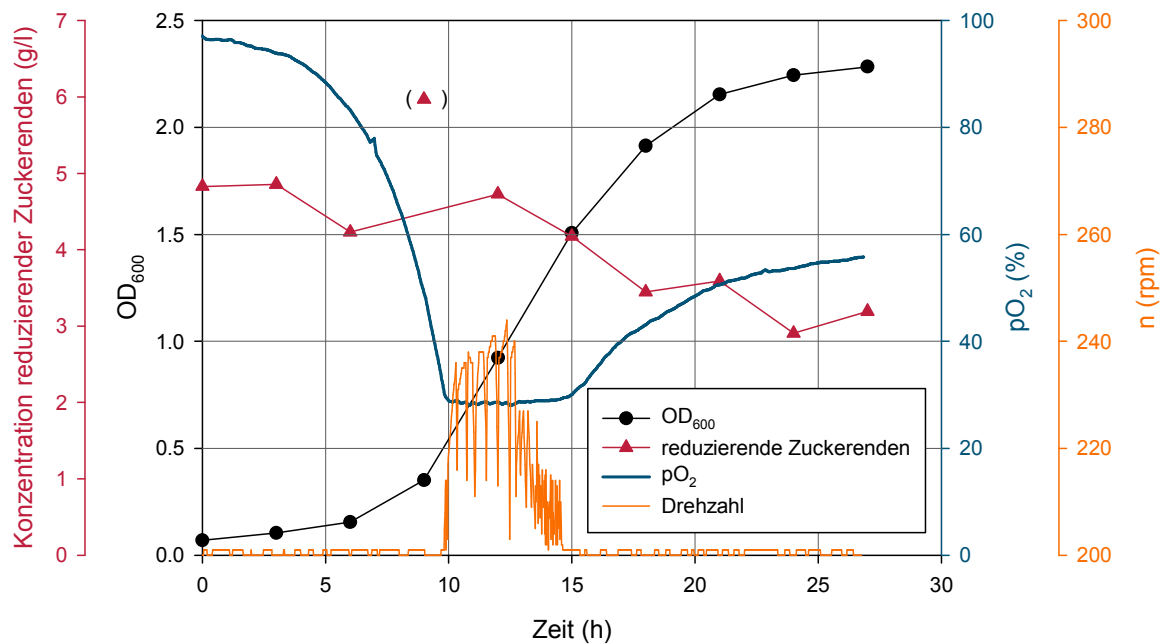
Der selbstisolierte Stamm MW-C3 kann auf Fucoidan (und weiteren Zuckern) als einziger Kohlenstoffquelle wachsen und bedarf nur anorganischen Stickstoff und Vitaminen in künstlichem Meerwasser. Für den Nachweis der Fucoidanase-Aktivität wurde die C-PAGE und die GPC verglichen. Mithilfe der C-PAGE wurde der Abbau des Fucoidans bei Kultivierung auf verschiedenen Zuckern bestätigt und aus Kostengründen wurde die Kultivierung mit Glucose als Hauptkohlenstoffquelle gewählt. Aus dem Kulturüberstand einer Schüttelkultur wurden mittels  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung Proteine aufkonzentriert, jedoch konnte die Enzymaktivität keiner Proteinbande zugeordnet werden.

## **3.5 Maßstabsvergrößerung der Kultivierung des Isolats MW-C3 und Spaltung des Fucoidans aus *Fucus vesiculosus***

### **3.5.1 MW-C3: Up-scaling der Kultivierung und des Nachweises von Fucoidanabbau**

Die Anreicherung des für die Fucoidanase-Aktivität verantwortlichen Proteins aus Schüttelkulturen war bisher nicht erfolgreich. Daher sollte eine Kultivierung im 3l-Bioreaktor-Maßstab durchgeführt werden, um größere Mengen Protein für die Aufreinigung zu erzielen. Dabei wurden Glucose als Kohlenstoffquelle und Fucoidan als Co-Substrat eingesetzt. Zusätzlich wurde Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle verwendet, da es als anorganische Stickstoffquelle bisher zu gutem Fucoidanabbau beitrug.

Für die Kultivierung wurde sowohl der pH-Wert reguliert (auf pH 7,0) als auch nicht reguliert (Anfangswert des pH bei 7,3). Der Verlauf der Kultivierung mit geregelter pH-Wert ist in Abbildung 3.29 abgebildet. Alle zwei Stunden wurde eine Probe entnommen und vermessen. Bei der Kultivierung sollte ein aerobes Wachstum vorliegen; deshalb wurde die Rührerdrehzahl so geregelt, dass, sobald der  $\text{pO}_2$  unterhalb von 30 % lag, die Drehzahl erhöht wurde.

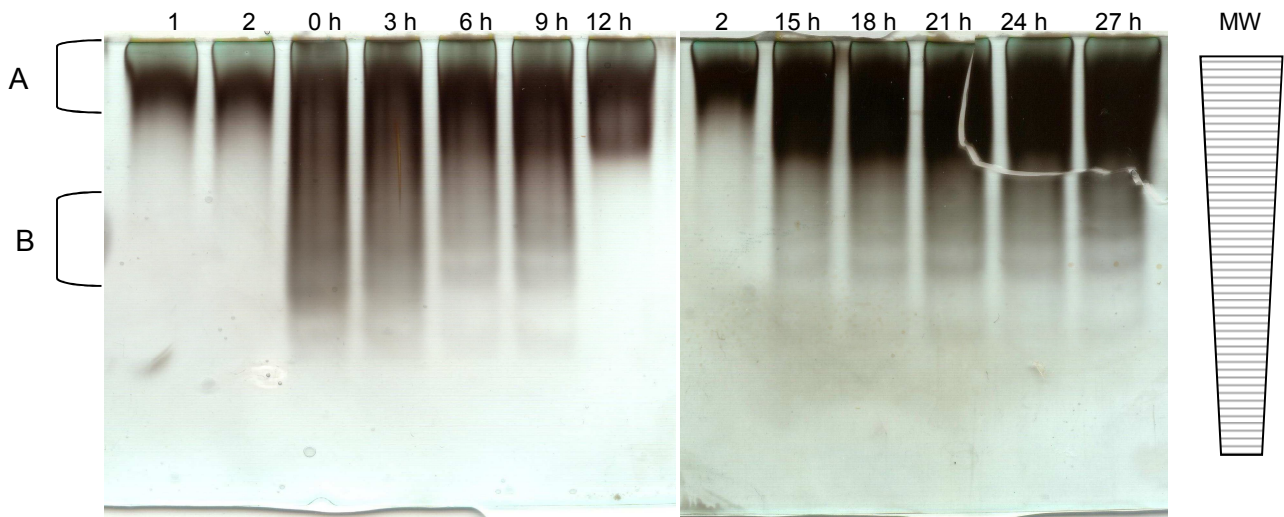


**Abbildung 3.29: Bioreaktorkultivierung von MW-C3 (pH reguliert bei 7,0).**

Bedingungen: 3 L-Bioreaktorkultur; ASW-Medium: Glucose (5 g/l) und Fucoidan (0,2 g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM); 50 mM MOPS (pH 7,0), 25 °C, Belüftung von 0,5 l l<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. Regulierung der Drehzahl (200-800 rpm) bei Unterschreiten eines pO<sub>2</sub> < 30%.

Bei der Betrachtung des Wachstums ist erkennbar, dass keine lag-Phase vorliegt. Die exponentielle Wachstumsphase geht ab der 10. Stunde in die Übergangsphase über und die stationäre Phase tritt nach ca. 25 Stunden ein. Der Verlauf der reduzierenden Zuckerenden (DNS-Test) sinkt vom Startpunkt (5 g/l) bis 6 h. Die Konzentration sinkt nach 15 h ab, bis ein Wert von 3 g/l erreicht wird. Der Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>) sinkt auf einen Wert von 30%, gemäß den Einstellungen des Reaktors. Zeitgleich setzt die Erhöhung der Drehzahl ein, damit der pO<sub>2</sub>-Wert nicht unter einen Wert von 30% sinkt. Ab Stunde 15 nimmt die respiratorische Aktivität des Organismus ab. Dies stimmt überein mit der optischen Dichte, da der Übergang in die stationäre Phase eintritt.

Während der Kultivierung im Bioreaktor wurde auch der Fucoidanabbau gemessen und dessen Verlauf qualitativ in Abbildung 3.30 dargestellt. Über den gesamten Verlauf der Kultivierung ist eine Zunahme von geladenen Oligosacchariden zu erkennen.



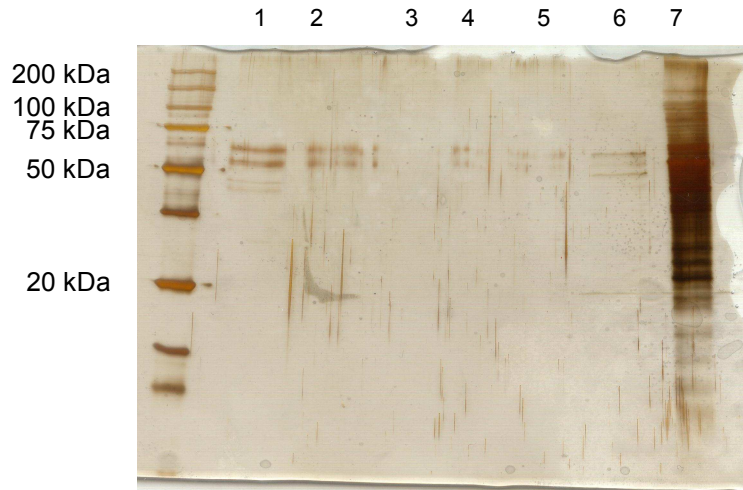
**Abbildung 3.30: C-PAGE des Enzymaktivitätstests der Überstandspuben aus der Bioreaktorkultivierung.**

Enzymaktivitätstest: 300 µl Enzymlösung + 100 µl Substrat bei 25 °C; Spur 1: Fucoidanlösung, Spur 2: Nullprobe. Bereich A: hochmolekulares Fucoidan, Bereich B: Laufweite von Phenolrot; die Zeitangaben beziehen sich auf die Kultivierungsdauer des Bioreaktors.

Bereits zu Beginn der Kultivierung (0 h) ist Enzymaktivität nachweisbar (zurückzuführen auf das Inokulum), welche anschließend abnimmt und nach 12 Stunden sehr gering ist. Ab Stunde 15 ist die Enzymaktivität höher und bleibt bis zum Ende der Kultivierung konstant. Besonders auf die Bildung von erkennbaren Banden (Oligosaccharide) in den Stunden 15-27 soll hingewiesen werden.

Nach Ende der Kultivierung wurde der Kulturüberstand mittels (Ultra-)Filtration und Ammoniumsulfatfällung aufkonzentriert (Kapitel 2.23), um eine Lösung mit höherer Enzymkonzentration und -aktivität zu erhalten.

In Abbildung 3.31 ist eine SDS-PAGE dargestellt, die die Proteinproben der einzelnen Anreicherungsschritte des Kulturüberstandes zeigt. Es fällt auf, dass das Proteinmuster der Schüttelkulturen [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Fällung /Spur 7] stärker ausfällt als das der Bioreaktor-Kultur (Spur 4).



**Abbildung 3.31: SDS-PAGE der Proteinaufarbeitung Bioreaktor.**

Spur 1: Filtrat, Spur 2: Filtrat der Ultrafiltration, Spur 3: Retentat der Ultrafiltration, Spur 4:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung (60%), Spur 5: Retentat, Spur 6: Überstand 27 h pH ungeregelt, Spur 7:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung (40%) Schüttelkolben.

Die gewonnenen Fraktionen und deren Volumenreduktion sind in Tabelle 3.16 zusammengefasst. Zusätzlich wurde die Enzymaktivität der Fraktionen überprüft und ebenfalls in dieser Tabelle benannt.

**Tabelle 3.16: Aufarbeitung des Kulturüberstandes (Bioreaktor).**

Reduktion (%) im Verhältnis zum eingesetzten Volumen, Gesamt: Im Verhältnis zum Anfangsvolumen (3 l).  
+ = positiv, - = negativ

Schritt	Volumen		Enzymaktivität
	(l)	(%)	
Kulturüberstand	3	100	+
Filtration (0,4 $\mu\text{m}$ )	2,75	92	+
Ultrafiltration (10 kDa)			
Retentat	1,35	49	+
Filtrat	1,4		-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung (60 %)	0,70	23	+

Da durch die erste SDS-PAGE (Abbildung 3.31) der einzelnen Fraktionen Banden kaum zu erkennen bzw. der Enzymaktivität zuzuordnen waren, wurde eine weitere Ultrafiltration durchgeführt. Hierbei wurde bestätigt, dass geladene Oligosaccharide in der Fraktion größer 10 kDa gebildet werden.

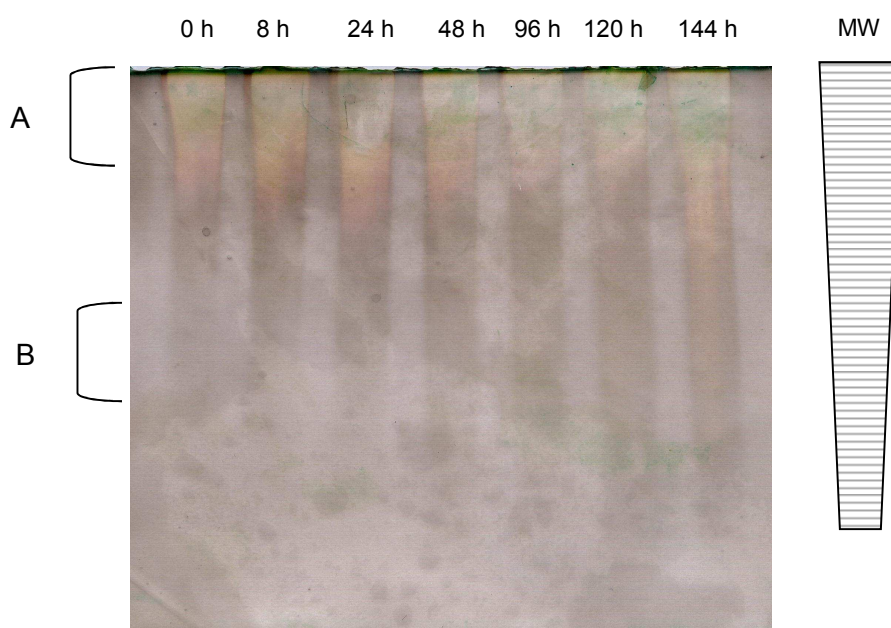
Der aus der Bioreaktorkultivierung gewonnene Kulturüberstand wurde genutzt, um eine aufkonzentrierte Enzymlösung herzustellen, die für eine Hydrolyse des Fucoidans aus *Fucus vesiculosus* genutzt werden soll. Die Aufreinigungsschritte dienten zum einen dazu, das Volumen einzuengen, zum anderen sollten noch vorhandene Zucker entfernt werden, und um das Enzym möglichst rein zu erhalten.



Als Resultat dieser Schritte konnte eine Lösung mit 700 ml nach Filtration, Ultrafiltration und Ammoniumsulfatfällung (60 %) gewonnen werden, welche für die enzymatische Hydrolyse von selbstextrahiertem Fucoidan verwendet wurde.

### 3.5.2 Enzymatische Hydrolyse von Fucoidan aus *Fucus vesiculosus*

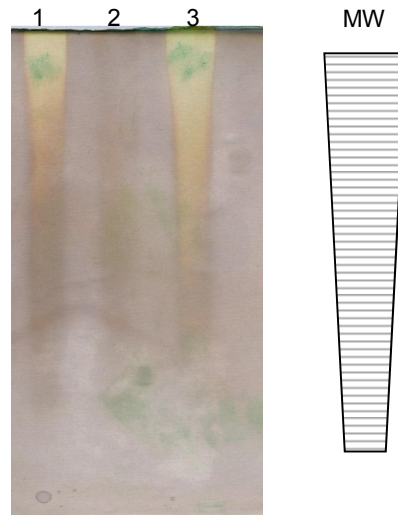
Über die Dauer von sieben Tagen wurde Fucoidan mit der aufkonzentrierten Enzymlösung, die nach der Bioreaktorkultivierung hergestellt wurde, inkubiert. Mithilfe der C-PAGE konnte die Zunahme an Fucoidanabbauprodukten beobachtet werden (Abbildung 3.32).



**Abbildung 3.32: C-PAGE der enzymatischen Spaltung mit angereicherter Enzymlösung  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung] aus dem Bioreaktor-Ansatz.**

Bedingungen: Enzymatische Spaltung bei 25 °C; Bereich A: hochmolekulares Fucoidan, Bereich B: Laufweite von Phenolrot. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubationsdauer der Hydrolyse.

Es ist erkennbar, dass nicht das gesamte Fucoidan in der Reaktion umgesetzt wurde, weshalb nach Beenden der Reaktion die Oligosaccharide von dem nicht verbrauchten Fucoidan durch Ultrafiltration getrennt wurden (Abbildung 3.33). Anschließend wurde die Fraktion mittels FPLC aufgereinigt und die entstandenen Produkte für weitere Analysen eingesetzt wurden.



**Abbildung 3.33: C-PAGE nach enzymatischer Spaltung.**

Spur 1: nach 144 h nach Spaltung, Spur 2: Filtrat nach Ultrafiltration (50 kDa MWCO), Spur 3: Retentat nach Ultrafiltration (50 kDa MWCO).

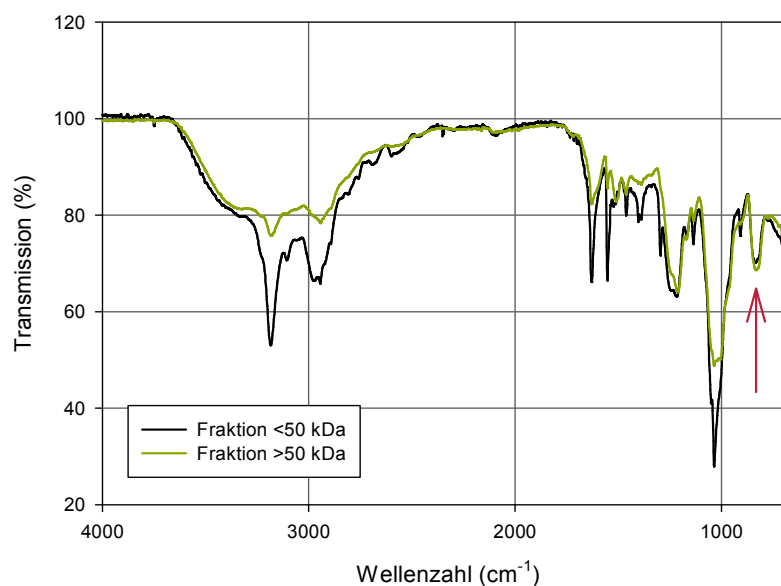
Ein Unterschied zwischen dem Filtrat und dem Retentat ist erkennbar, wobei das hochmolekulare Fucoidan nicht mehr in der Fraktion des Filtrats vorhanden ist. Jedoch ist die Trennung der Poly-/Oligosaccharide nicht, wie gewünscht, komplett gelungen, da im Retentat noch niedermolekulare Fucoidanabbauprodukte enthalten sind.

### Analyse der Spaltprodukte

Um nachzuweisen, dass Fucoidan unter Erhalt der Sulfatgruppen gespalten wurde, wurden verschiedene Analysen durchgeführt. Zum Einen wurde eine Infrarotspektroskopie (IR) und eine Elementaranalyse durchgeführt, um den Schwefel an den Molekülen nachzuweisen. Zum Anderen wurde eine Gelpermeationschromatographie durchgeführt, um das Molekulargewicht der Oligosaccharide zu bestimmen.

In Abbildung 3.34 sind die Infrarotspektren der Fraktionen nach der enzymatischen Spaltung mit der Enzymlösung dargestellt.





**Abbildung 3.34: Infrarotspektren der Fraktion <50 kDa und >50 kDa nach enzymatischer Hydrolyse mit Enzymlösung aus dem Bioreaktor. Vor Entsalzung. [TU Kaiserslautern]**

Die Peaks bei 832 cm<sup>-1</sup> und 820 cm<sup>-1</sup> weisen auf Sulfatgruppen innerhalb der Substanzen hin. Nach der Entsalzung wurde eine Elementaranalyse durchgeführt.

**Tabelle 3.17: Elementaranalyse verschiedener Fucoidanproben. [TU Braunschweig, Institut f. Pharmazeutische Chemie]**

Probe	molares Verhältnis (C:H:N:S)	Verhältnis Sulfatgruppe pro Fucose
Fucoidan ( <i>Fucus vesiculosus</i> )	1:2,24:0,007:0,129	0,77:1
Fucoidan ( <i>Laminaria digitata</i> )	1:2,20:0,017:0,145	0,87:1
Oligosaccharid < 50 kDa (von <i>Fucus vesiculosus</i> )	1:10,359:-:0,137	0,82:1

Die Ergebnisse der Elementaranalyse ergaben, dass ungefähr 80 % der Fucoseeinheiten sulfatiert sind (siehe Tabelle 3.17).

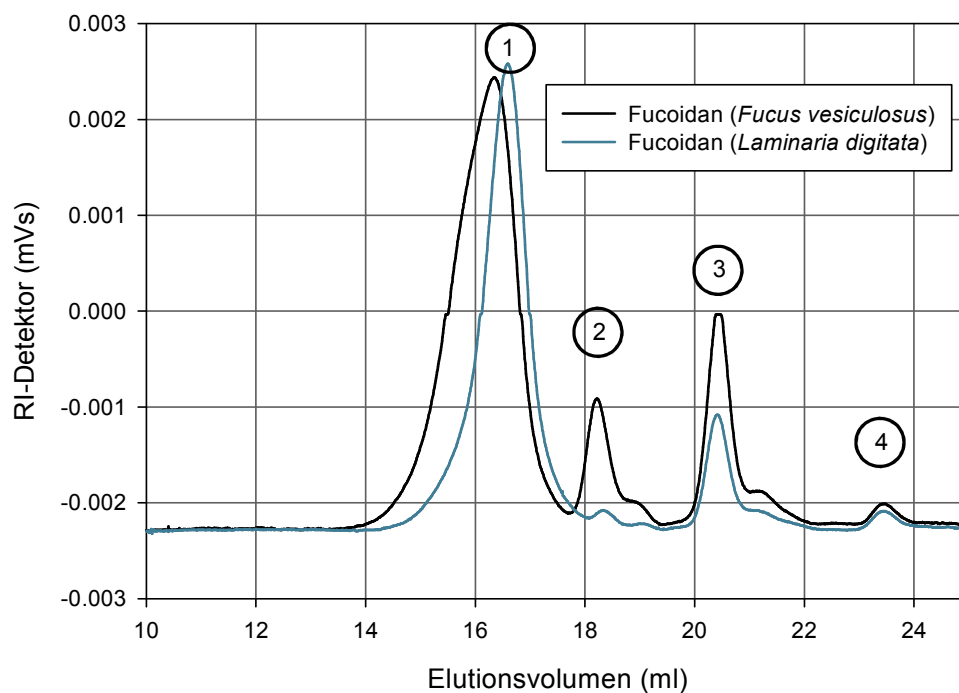
### 3.5.3 Molekulargewichtsbestimmung durch GPC-Viskosimetrie

Die Bestimmung des Molekulargewichts ist aufgrund des anionischen Charakters des Polysaccharids nicht trivial. Die Standardkalibrierung für die Auswertung ist nicht ideal, da zumeist keine geladenen Polysaccharide als Standards vorhanden sind und durch unterschiedliche physikalische Eigenschaften nicht das gleiche Molekulargewicht des entsprechenden hydrodynamischen Volumens besitzt. Dies würde zu einer ungenauen Bestimmung des Molekulargewichts führen. Daher soll im Folgenden die Messung und Auswertung mit einer Gelpermeationschromatographie erfolgen, die mit einem

Viskositätsdetektor ausgestattet ist, damit hierdurch eine universelle Kalibrierung erfolgen kann.

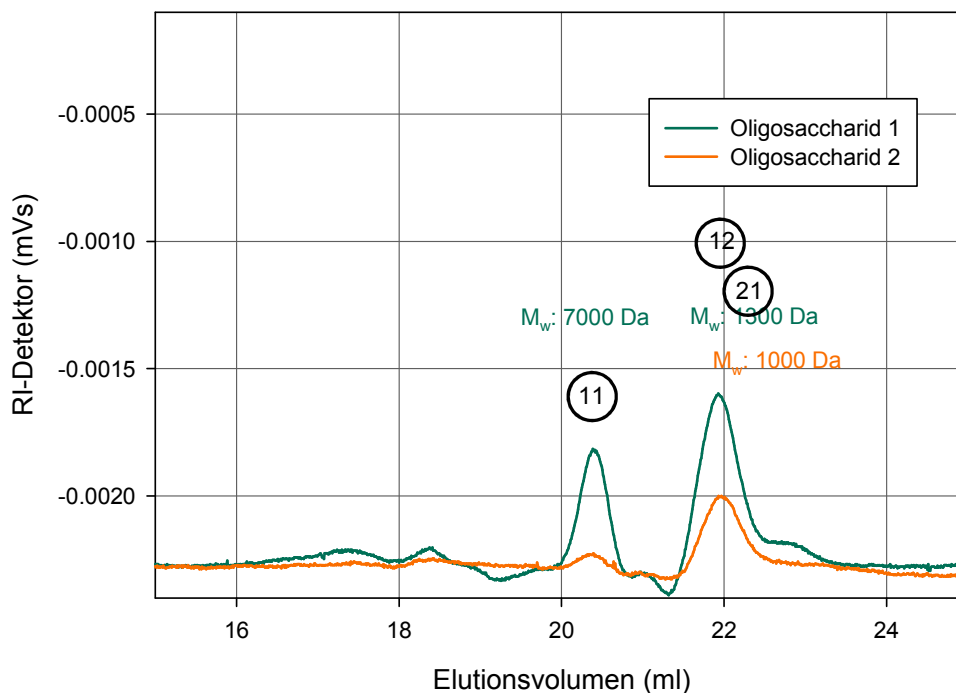
Hierbei wurden native Fucoidane von den Algen *Fucus vesiculosus* und *Laminaria digitata* und zusätzlich die enzymatisch aus Fucoidan (aus *Fucus vesiculosus*) hergestellten Oligosaccharide (beschrieben in Kapitel 3.5.2) vermessen.

In Abbildung 3.35 ist ein charakteristisches Elugramm des RI-Detektors von zwei Fucoidanen (*Fucus vesiculosus* und *Laminaria digitata*) dargestellt.



**Abbildung 3.35: Elugramm von zwei Fucoidanen (*Fucus vesiculosus* und *Laminaria digitata*).**  
Molekulargewichte einzelner Peaks siehe Tabelle 3.18.

Nach der enzymatischen Hydrolyse des Fucoidans aus *Fucus vesiculosus* und der Ultrafiltration, (um die Oligosaccharide von dem hochmolekularen Fucoidan zu trennen) wurden beide Proben der Oligosaccharide ebenfalls mittels der GPC vermessen. Die Elugramme sind in Abbildung 3.36 abgebildet. Zu erkennen ist die wesentlich geringere Konzentration und das kleine Molekulargewicht der Spaltprodukte. Aufgrund der kleinen Größe ist es nicht möglich, die Molekulargewichte mit der universellen Kalibrierung zu bestimmen, da die Mark-Houwink-Beziehung nur bei Molekulargewichten oberhalb von 20 kDa angewendet werden kann.



**Abbildung 3.36:** Elugramme der Oligosaccharide, erhalten durch die enzymatische Spaltung des Fucoidans von *Fucus vesiculosus* (50 kDa Ultrafiltrat).

Anhand der Werte aus Tabelle 3.18 ist zu erkennen, dass das Molekulargewicht von den Oligosacchariden sich deutlich von denen des eingesetzten Fucoidans unterscheidet.

**Tabelle 3.18:** Übersicht der Molekulargewichte des Fucoidans und dessen Oligosaccharide aus der enzymatischen Hydrolyse.

Substanz	Peak	Konzentration injiziert (g/l)	Konzentration berechnet (g/l)	Elutionsvolumen (ml)	$M_w$ (Da)
Fucoidan ( <i>Fucus vesiculosus</i> )	1	0,775	0,540	16,400	1.836.200 <sup>a)</sup>
	2		0,073	18,212	58857
	3		0,124	20,491	6203
	4		0,017	23,503	230
Oligosaccharid 1	11	0,4	0,069	20,461	7224
	12		0,159	21,886	1304
Oligosaccharid 2	21	1,455	0,586	21,993	1126

<sup>a)</sup>Wert durch universelle Kalibrierung ermittelt

Zusammenfassend ist zu erklären, dass sulfatierte Oligosaccharide nach der Hydrolyse vorliegen, was bedeutet, dass die Hydrolyse des nativen Fucoidans durch gebildete Enzyme von MW-C3 erfolgreich war. Jedoch ist die Zusammensetzung durch Elementaranalyse nicht vollständig geklärt. Ebenso konnte aufgrund des geringen Molekulargewichts die genaue Bestimmung der Größe nur durch Standardkalibrierung erfolgen.

### **Zusammenfassung**

Nach zahlreichen Versuchen im Schüttelkultur-Maßstab wurde MW-C3 in einem 3 l-Bioreaktor Maßstab kultiviert. Durch eine anschließende Aufarbeitung des Kulturüberstands wurde eine Enzymlösung erhalten, die für die enzymatische Spaltung von Fucoidan aus *Fucus vesiculosus* eingesetzt wurde. Die Abbauprodukte wurden mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) aufgereinigt und das Molekulargewicht der Oligosaccharide wurde auf ca. 1 bzw. 7 kDa bestimmt. Zusätzlich wurde durch Elementaranalyse ermittelt, dass etwa 80 % der Fucoseeinheiten eine Sulfatierung aufwiesen.

## 4 Diskussion

Fucoidane sind seit Anfang des 20. Jahrhunderts bekannt (Kylin, 1913). Ihre Zusammensetzung aus sulfatierten Fucoseeinheiten und einigen weiteren Monosacchariden wurde schon damals untersucht, aber die erste Struktur für das Fucoidan aus *Fucus vesiculosus* wurde erst in den 1950er Jahren veröffentlicht. Diese Struktur wurde Anfang der 90er Jahre überarbeitet und revidiert (Patankar *et al.*, 1993).

Allerdings bestehen die Strukturen nur aus Motiven, da es große Unterschiede in der Zusammensetzung der einzelnen Fucoidane, insbesondere zwischen den verschiedenen Algenarten, gibt. Zusätzlich sind diese Moleküle mit einem Molekulargewicht bis zu über einer Million Dalton sehr groß, was eine Aufklärung der Struktur nicht einfach macht (Holtkamp *et al.*, 2009).

Die Hydrolyse durch Säure wurde durchgeführt und trug zu der Aufklärung der Struktur motive bei; jedoch sind die Sulfatgruppen gefährdet, durch Hydrolyse abgespalten zu werden. Speziell für die vielversprechenden Bioaktivitäten von Fucoidan bzw. seinen Spaltprodukten könnte dieser Sulfatgruppenverlust eine Reduktion der Bioaktivität bedeuten (Nishino und Nagumo, 1992).

Um einerseits das Bioaktivitätspotenzial von Fucoidanabkömmlingen mit niedrigerem Molekulargewicht testen zu können, und andererseits mit der Aufklärung der vollständigen Molekülstruktur weiter zu kommen, wäre es von nutzen, eine milde enzymatische endo-Spaltung anzustreben.

Seit den 1950er Jahren wurden Mikroorganismen mit Fucoidanase-Aktivität beschrieben und untersucht. Diese stammten überwiegend aus marinen Habitaten (Kusaykin *et al.*, 2008). Trotzdem konnten bisher nur wenige Organismen gefunden werden, die nachweislich Fucoidan spalten können. Die Enzymaktivität beschränkt sich häufig nur auf Fucoidan einer kleinen Anzahl von Algenarten und ist nicht universell für alle Fucoidane einsetzbar.

Bei den Untersuchungen zur Fucoidanase-Aktivität wurden häufig keine Enzyme aufgereinigt, sondern nur isolierte Mikroorganismen eingesetzt und die Bedingungen, unter denen sie Fucoidanase-Aktivität zeigten, beschrieben (Bakunina *et al.*, 2000).

Daher wurden zwei Strategien im Rahmen dieser Arbeit verfolgt: die rekombinante Produktion einer Fucoidanase und die Isolierung eines Mikroorganismus marinen Ursprungs mit Fucoidanase-Aktivität.

#### 4.1 Produktion von Fucanase FcnA aus *Mariniflexile fucanivorans*

Bei bekannter Sequenz eines Gens und dessen Produkt ist es vielversprechend, die rekombinante Produktion in einem Wirtstamm vorzunehmen. Häufig wird hierfür das Bakterium *Escherichia coli* genutzt.

Zu diesem Zweck wurde das Gen für die Fucoidanase ‚Sulfated fucanase FcnA‘ aus *Mariniflexile fucanivorans* (Colin *et al.*, 2006) in die Multiple Cloning Sites (MCS) des Vektors pET21a(+) kloniert und anschließend in verschiedene *E. coli* Stämme (BLR(DE3), Origami 2(DE3), Rosetta(DE3)) transformiert.

Nach der Klonierung des Gens in den Vektor wurde durch eine Sequenzierung die Vollständigkeit des Inserts bestätigt. Unter Standardbedingungen (37°C, 1 mM IPTG), ließ sich das Enzym in *E. coli* BLR (DE3) nicht löslich exprimieren. Daher wurden die Parameter der Induktion (Temperatur, IPTG-Konzentration) variiert. Jedoch wurde auch hierdurch keine lösliche Produktion des rekombinanten Proteins erreicht.

Da die Induktion auf dem lacZ-Promotor beruht, wurde überprüft, ob die Zugabe von Glucose zum Nährmedium die lösliche Expression des Proteins unterstützte. Denn der Promotor wird durch Katabolitrepression inhibiert, was ebenfalls zu langsameren Expression führt. Dies führte in Bezug auf die richtige Faltung der exprimierten Fucoidanase FcnA ebenso nicht zum Erfolg.

Der Western Blot des Pellets zeigte deutlich, dass das rekombinante Protein vorliegt, denn der His-Tag konnte über den Nachweis-Antikörper ( $\alpha$ -penta-His) nachgewiesen werden. Die Banden, die den Proteinen mit kleineren Molekülgrößen entsprechen, weisen darauf hin, dass bereits ein Abbau der Proteine in den Inclusion bodies stattgefunden hat. Daher würden bei Rückfaltungsversuchen die Fragmente unterschiedlicher Länge aufgereinigt werden. Zudem wäre es fraglich, ob die Enzymaktivität des Proteins bestehen bliebe (Hoffmann *et al.*, 2004).

Einer der verwendeten Stämme, der Origami 2-Stamm, ist eine *trxB/gor* Negativ-Mutante des BL21(DE3)-Stammes und soll die Bildung von Disulfid-Brücken im Cytoplasma verbessern (Sørensen und Mortensen, 2005). Der Rosetta-Stamm besitzt ein weiteres Plasmid pRARE, das für weitere tRNAs codiert, die in *E. coli* generell selten vorkommen (Berrow *et al.*, 2006).

Auch in diesen *E. coli*-Stämmen konnte das rekombinante Protein nicht löslich exprimiert werden; daher wurde das Gen in einen Vektor mit Signalsequenz *pelB* des *sec*-Pathways kloniert. Dieser Pathway ermöglicht es, dass die Polypeptidkette vor der Faltung in das Periplasma transportiert und dort gefaltet wird. Durch ‚Leakage‘ kann das Protein in den Kulturüberstand gelangen (Sørensen und Mortensen, 2005).

Bei geringen Temperaturen unterhalb von 20 °C verliefen Expression und Nachweis des Enzyms im Kulturüberstand positiv. Allerdings war die Konzentration des Enzyms sehr gering. Bei höheren Temperaturen wurde das Protein nicht löslich produziert.

Vermutlich war bei höheren Temperaturen die Expressionsrate zu hoch, was zu einer „Verstopfung“ des Pathways geführt haben könnte. Somit konnten sich eventuell Proteinaggregate oder, wie bereits bei der Expression im Cytoplasma, nach der Translation Inclusion bodies gebildet haben. Die Tatsache, dass das Protein erst nach fünf Stunden nachweisbar war, spricht für eine längere Verweilzeit während der Ausschleusung ins Periplasma.

Die Aufreinigung mithilfe der Nickel-Sephrose war nicht erfolgreich, wahrscheinlich aufgrund der niedrigen Ausgangskonzentration. Eventuell war die Menge an rekombinantem Protein zu klein, um eine erfolgreiche Aufreinigung des Enzyms zu gewährleisten. Nach dem Waschen des Materials und der Elution konnte kein Protein in den Fraktionen nachgewiesen werden. Es kann vermutet werden, dass Teile des Enzyms in den verschiedenen Fraktionen vorlagen, aber die Konzentration für einen Nachweis zu gering war.

Es war nicht möglich, die Konzentration des Proteins im Kulturüberstand zu erhöhen. Für den Einsatz des Enzyms in der Hydrolyse von Fucoidan ist dies natürlich unbefriedigend, da nicht genug Protein löslich produziert und aufgereinigt werden konnte.

Die Forschungsgruppe, die als erstes das *fcnA*-Gen beschrieben und auch kloniert hat, hatte ein anderes System angewendet, wobei das Gen in den pDEST17-Vektor kloniert wurde, der einen N-terminalen 6xHis-Tag besitzt. Der Vektor wurde dann in *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformiert. Das transformierte Bakterium wurde in M9 Medium kultiviert und die Induktion wurde mit 1 mM IPTG über Nacht bei 20°C durchgeführt. Bei dieser Expression wurde ebenfalls eine geringe Temperatur genutzt, jedoch wurde eine relativ hohe IPTG-Konzentration verwendet (Colin *et al.*, 2006).

Daher kann es möglich sein, dass ein N-terminaler His-Tag einem C-terminalen (wie im Fall des pET21a(+)) zu bevorzugen ist. Desweiteren könnte das Medium einen Einfluss auf die Expression haben. Allerdings wurde in Untersuchungen bestätigt, dass komplexeres Medium die erfolgreiche Faltung von Proteinen unterstützt (Blackwell und Horgan, 1991).

Abschließend ist zu bedenken, dass in der Literatur nicht belegt ist, dass die Fucoidanase FcnA das Fucoidan von *Fucus vesiculosus* spalten kann. Die Autoren untersuchten die ihnen zur Verfügung stehenden Fucoidane von *Pelvetia canaliculata*, *Ascophyllum nodosum* und *Fucus spiralis* (alle gehören zur Ordnung der Fucales), die von dem Bakterium und auch vom (isolierten) rekombinanten Protein gespalten wurden (Descamps *et al.*, 2006).

In den eigenen Arbeiten konnten obige Materialien nicht zum Test eingesetzt werden, weil sie nicht zugänglich sind.

## **4.2 Isolierung und Kultivierung eines marinen Bakteriums mit Potenzial zur Fucoidan-Spaltung**

Aufgrund der Problematik der rekombinanten Expression der Fucoidanase FcnA in *E. coli* sollte eine alternative Quelle für die enzymatische Spaltung von Fucoidan genutzt werden. Da bereits verschiedene Arbeitsgruppen über Mikroorganismen mit Fucoidanase-Aktivität berichtet haben, die sie aus Küstengebieten bzw. marinen Habitaten isoliert haben, wurde dies als Alternative angesehen (Descamps *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Morinaga *et al.*, 1981).

Generell wurde nach folgendem Schema verfahren:

- Isolierung von marinen Mikroorganismen
- Kultivierung der Proben in meerwasserhaltigem Nährmedium (künstlich oder natürlich)
- Mehrfaches Überimpfen der Kulturen in fucoidanhaltigem Medium
- Auswahl von geeigneten Isolatn durch Messung der Fucoidanabnahme im Kulturmedium (Zunahme von reduzierenden Zuckern, Abnahme der Trübung nach Zusatz von BSA-Lösung (pH 3,7))

### **Isolierung mariner Bakterien vom Südstrand/Wilhelmshaven**

Im Rahmen der eigenen Isolierung von marinen Mikroorganismen mit dem Potenzial zum enzymatischen Abbau von Fucoidan aus *Fucus vesiculosus* wurde die Durchführung sehr nah an die Isolierungsmethode von Morinaga *et al.* (1981) angelehnt. Zunächst wurden von der Fundstelle der Algen in Wilhelmshaven Proben genommen und in verschiedenen Medien, basierend auf Meerwasser mit dem Zusatz von Fucoidan, kultiviert. Da das wiederholte Überimpfen der Kulturen als ausschlaggebender Schritt für die Anreicherung von Mikroorganismen mit der gewünschten Fucoidanase-Aktivität beschrieben wurde, wurde dies ebenfalls durchgeführt.

Von diesen verschiedenen Medien wurden ca. 20 Bakterien isoliert, die in der Lage waren, Fucoidan im Kulturmedium zu verbrauchen. Dies wurde durch den Trübungstest mit BSA-Lösung (pH 3,7) nachgewiesen.

Die Vereinzelung der Kulturen mit geeigneten Verdünnungen auf Agarplatten und das Screening von einzelnen Klonen wurde ebenfalls ähnlich wie in der bereits genannten Veröffentlichung ausgeführt (Morinaga *et al.*, 1981).



Als Unterschied ist anzumerken, dass die Zusammensetzung der Isolierungsmedien voneinander abwich. In dieser Arbeit wurde ein ähnliches Medium verwendet, wie bei der Isolierung von *Mariniflexile fucanivorans* (MB2-Medium) (Descamps *et al.*, 2006). Zusätzlich wurde ein Medium mit höherer Konzentration an Komplexbestandteilen (MB-Medium) und ein drittes ohne den Zusatz von Komplexbestandteilen benutzt (MW-Medium), um den unterschiedlichen Nährstoffansprüchen verschiedener Mikroorganismen gerecht zu werden. Die Verwendung von 96-well Platten, um kleinere Volumina und somit eine Kosten- und Zeitersparnis zu erhalten, stellte einen Unterschied zu der oben genannten Isolierungsmethode dar.

Da die Abnahme der Trübung des Trübungstests direkt im Zusammenhang mit der Verwertung von Fucoidan steht, konnte die Fucoidanase-Aktivität der Mikroorganismen wesentlich spezifischer nachgewiesen werden, als bei der Messung der Zunahme von reduzierenden Enden im Kulturüberstand. Insbesondere im Fall des Alginatabbaus, bei dem dieser Trübungstest ebenfalls eingesetzt wurde, konnte die Enzymaktivität einer Alginat-Lyase schneller nachgewiesen werden (Kitamikado *et al.*, 1990).

Allerdings ist es notwendig, die Enzymaktivität mit weiteren Methoden oder Kultivierungsexperimenten zu bestätigen, da der Trübungstest nur auf pseudo-quantitativen Bestimmungen beruht (Die Messung der Trübung erfolgt durch visuellen Vergleich von bekannten Fucoidanlösungen).

Zu diesem Zweck wurde untersucht, ob die isolierten Mikroorganismen in der Lage sind, künstliches Meerwasser als Grundlage eines Nährmediums zu nutzen. Dem Medium wurden die, in Fucoidan vorhandenen Monosaccharide - Fucose, Glucose, Galactose, Mannose und Xylose - als Kohlenstoffquelle zugefügt.

Dass etwa die Hälfte der Bakterien in künstlichem Meerwasser als Nährmediumsgrundlage nicht wuchsen, konnte erwartet werden, da sie auf Medium mit hohen Komplexbestandteilen isoliert worden waren. Angesichts der Tatsache, dass diese Mikroorganismen während der Kultivierung die Trübung durch Fucoidan verringerten, kann trotzdem nicht ausgeschlossen werden, dass sie ebenfalls in der Lage sind, Fucoidan zu spalten. Jedoch wäre ein Nachweis zeitintensiver gewesen, da erst die Bedingungen für die Produktion des Enzyms hätten gefunden werden bzw. zusätzlich der aufwendige Nachweis für die Enzymaktivität erbracht werden müssen.

Dennoch zeigten die auf natürlichem Meerwasser und auf Medium mit geringerem Gehalt an Komplexbestandteilen isolierten Bakterien Wachstum auf künstlichem Meerwasser basierendem Nährmedium.

Drei Bakterien kamen am Ende in die in die engere Wahl für weitergehende Studien. Nur eines davon, das Isolat MW-C3, war fähig auf künstlichem Meerwasser mit Fucoidan zu wachsen, wenn das Inokulum ebenfalls auf künstlichem Meerwasser-Medium herangewachsen war.

Es kann angenommen werden, dass die beiden anderen Bakterien nicht das Fucoidan als Kohlenstoffquelle genutzt haben, sondern dass sie für das Wachstum die vom Inokulum übertragenen Komplexbestandteile verwertet haben. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Isolate Fucoidan als Kohlenstoffquelle nutzen könnten, aber dass ein für sie wichtiger Nährstoff, z.B. ein weiteres Vitamin, nicht vorhanden war und somit kein Wachstum möglich war.

Die Implikation, dass es sich bei dem Isolat MW-C3 aufgrund der Fähigkeit Fucoidan als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen, um einen Fucoidanase-produzierenden Stamm handelt, ist demnach gut begründet. Im Fall des Fucoidanase-positiven Stamms *Sphingomonas paucimobilis* PF-1 war auch die Verwertung des Fucoidans von *Undaria pinnatifida* ein erstes Indiz für das Vorliegen eines entsprechenden Enzyms (Kim *et al.*, 2008).

### **Charakterisierung des bakteriellen Isolats MW-C3**

Das marine Isolat MW-C3 wurde für weiterführende Studien hinsichtlich der Fucoidanase-Aktivität ausgewählt. Daher sollten zunächst die phänotypischen und biochemischen Eigenschaften untersucht werden.

Bei dem gram-negativen Stamm handelt es sich um ein Bakterium aus der Familie der *Flavobacteriaceae*. Dies wurde durch die Sequenzierung der 16S rDNA nachgewiesen. Besonders dieser Vergleich hat aufgrund der sehr stark konservierten Sequenzen eine hohe Aussagekraft. Bereits durch Sequenzidentitäten unterhalb von 97 % können Stämme verschiedenen Arten zugeordnet werden; unterhalb von 95 % können unterschiedliche Gattungen vorliegen (Tindall *et al.*, 2010). Der Abgleich der Sequenz mit der Datenbank des Ribosomal Database Projects legte eine Verwandtschaft zu den Gattungen *Tenacibaculum* und *Polaribacter* nahe (Cole *et al.*, 2009).

Zusätzlich wurde die 16S rDNA Sequenz mit Sequenzen von kultivierten Bakterien verglichen. Es wurden 4 Bakterienstämme gefunden, die sehr nahe verwandtschaftliche Beziehungen zu dem Stamm MW-C3 besitzen. Insbesondere die Stämme SA-0082 und CZ1127 zeigten mit über 96 % Übereinstimmung der Sequenzen eine nahe Verwandtschaft. Diese fünf Stämme könnten demnach zu einer noch nicht beschriebenen Gattung innerhalb der Familie der *Flavobacteriaceae* gehören (Bernardet *et al.*, 2002).

Da die Einordnung in verwandtschaftliche Verhältnisse nicht ausschließlich auf der 16S rDNA beruht, wurde der Metabolismus des Organismus untersucht. Die verwerteten Kohlenstoffquellen des Stammes deuten auf eine sehr spezialisierte Nutzung von Kohlenstoffquellen hin. Er verwendete für seinen Stoffwechsel nur Zucker oder andere Stoffe, die in Fucoidan vorhanden sind. Auch in der Literatur wird häufig von Monosacchariden wie Fucose, Glucose, Xylose, Galactose, Mannose oder Glucuronsäuren als Bestandteil von Fucoidan berichtet (Cumashi *et al.*, 2007; Kusaykin *et al.*, 2008).

Der Zuckeralkohol Mannit kann ebenfalls in Braunalgen gefunden werden und liegt im Gegensatz zu den Monosacchariden wie Glucose, Fructose und Saccharose in messbaren Mengen in freier Form vor (Yamaguchi *et al.*, 1969). Das komplexere Polysaccharid Laminarin, das auch als Kohlenstoffquelle angeboten wurde, konnte der Stamm nicht verwerten (PM2A-Platten), obwohl dieser Stoff in Braunalgen als Speicherstoff vorkommt (Obluchinskaya, 2008).

Da MW-C3 keine Substrate aus dem Zitratzyklus verwerten konnte (Anhang, Abbildung 10.1 - Abbildung 10.4), kann davon ausgegangen werden, dass der Energiegewinn nicht hierdurch erfolgt. Möglich wäre die Nutzung des Fructose- und Mannose-Metabolismus, in dem auch Fucose vorhanden ist (Kanehisa *et al.*, 2010).

Die Verwertung von anorganischem Stickstoff ist recht gut; dagegen werden nur wenige organische Stickstoffquellen (L-Aspartat, L-Asparagin, L-Glutamat, L-Glutaminsäure) als Ammoniumdonoren genutzt. Jedoch ist bemerkenswert, dass der Stamm kein Nitrit verwerten kann, jedoch Nitrat. Da bei der Nutzung von Nitrat die Umwandlung zu Nitrit und dann weiter zu Ammonium erfolgt, müsste der Stamm auch dieses verwerten können (Richardson und Watmough, 1999). Aus dem Ammonium können über die Aminosäuren L-Asparagin, L-Aspartat, L-Glutamin und L-Glutamat durch Transamination weitere Aminosäuren gebildet werden (Umbarger, 1978). Sie können jedoch nicht als Kohlenstoffquelle dienen.

Überraschend war die große Flexibilität in der Verwertung von Phosphatquellen, da eine Vielzahl an sowohl anorganischen als auch organischen phosphorylierten Substanzen genutzt wurden. Im Gegensatz dazu wurde nur eine geringe Zahl an Sulfatquellen verwendet. Sulfat und Thiosulfat können direkt im Schwefelmetabolismus eingesetzt werden. Das 3-Sulfinyl-L-alanine (L-Cystein-Sulfinsäure) kann durch Sulfit ebenfalls in den Schwefelmetabolismus verstoffwechselt werden. Dies würde bedeuten, dass L-Cystein als Schwefelquelle ebenfalls geeignet wäre. Dass Methionin oder andere Schwefelquellen nicht genutzt werden, könnte an der Verfügbarkeit von Schwefel in Form von anorganischen Verbindungen, die im

Meerwasser in großer Menge vorhanden sind, liegen. Dies könnte das Recycling von Schwefelquellen im Organismus überflüssig werden lassen (Sekowska *et al.*, 2002).

### **MW-C3: Wachstum und enzymatische Spaltung von Fucoidan**

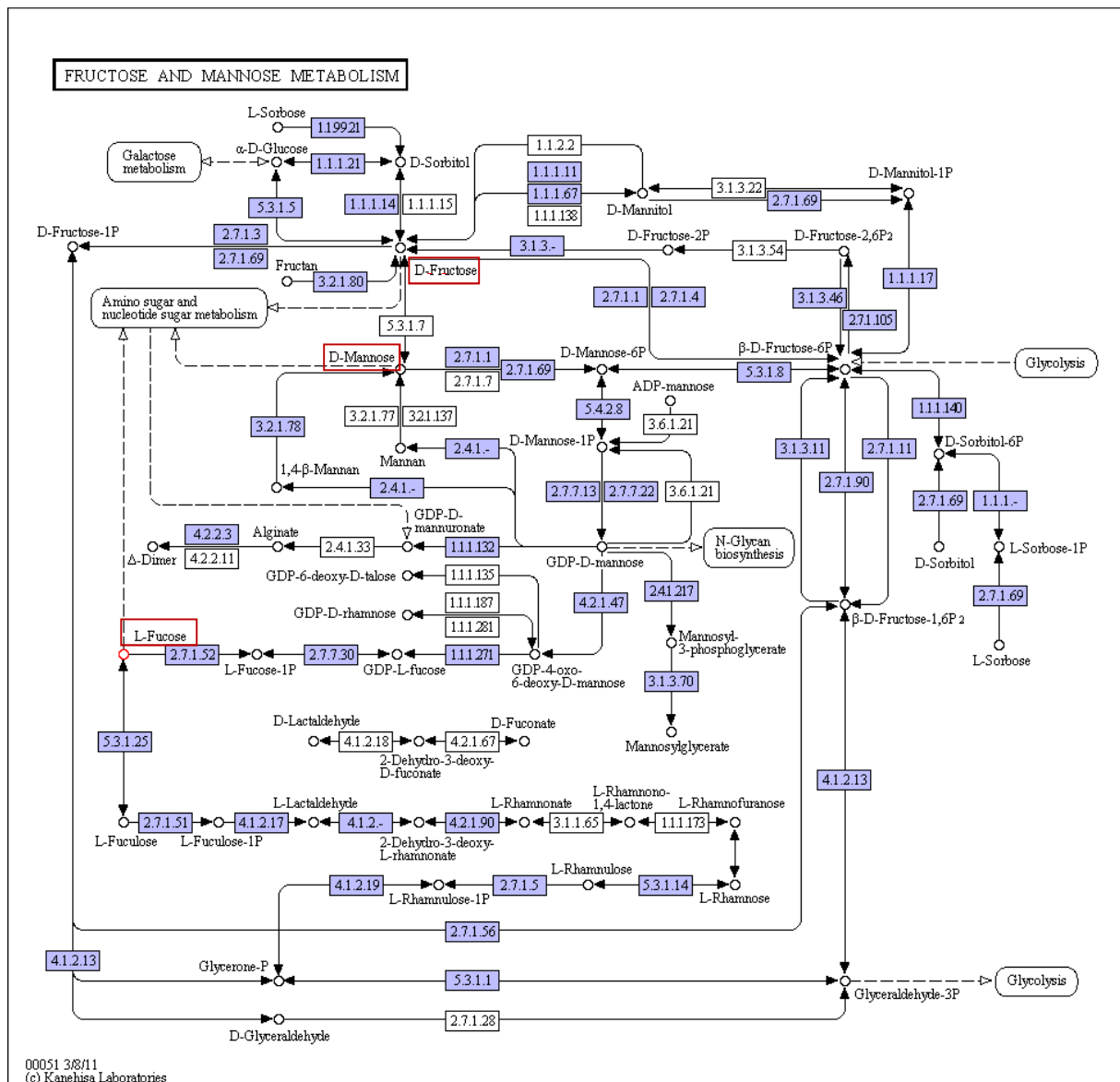
Nach der erfolgreichen Isolierung eines potentiellen Fucoidanase-Produzenten und dessen Charakterisierung sollten die Bedingungen für die Produktion des Enzyms untersucht werden. Dafür wurde das Bakterium MW-C3 (Familie: *Flavobacteriaceae*) auf Meerwassermedium mit verschiedenen Zusätzen kultiviert.

Wie schon in der Untersuchung des Kohlenstoffmetabolismus zu beobachten war, konnte das marine Isolat größtenteils nur Zucker als Kohlenstoffquelle verwenden. Deshalb wurden als Kohlenstoffquelle für das Wachstum nur Monosaccharide bzw. Saccharose oder Fucoidan eingesetzt.

Die höchsten Werte der optischen Dichte  $OD_{600}$  konnten bei Fucose, Mannose und Glucose gemessen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit den metabolischen Untersuchungen; denn Fucose und Mannose können über den Fructose- und Mannose- Metabolismus verstoffwechselt werden (Abbildung 4.1).

Das Wachstum auf Glucose ist erstaunlicherweise langsamer, was auf eine nicht optimale Nutzung von Glucose als Kohlenstoffquelle schließen lässt. Zusätzlich sieht man, dass der Verlauf der Kurven der  $OD_{600}$  von Fucose und Fucoidan sehr ähnlich sind. Da Fucoidan hauptsächlich aus Fucose besteht, ist dies nicht unrealistisch. Scheinbar besitzen die fucoidanspaltenden Enzyme eine hohe Aktivität, um das Fucoidan für das Bakterium verfügbar zu machen und somit zu einem ähnlich guten Wachstum wie auf Fucose allein zu führen. Aufgrund des sehr hohen Molekulargewichts kann Fucoidan nicht durch Diffusion in die Zelle gelangen und muss außerhalb der Zelle abgebaut werden (Ziervogel und Arnosti, 2008).

Jedoch hat eine Erhöhung der Substratkonzentration im Fall von Fucoidan keinen positiven Effekt auf das Wachstum. Der Verlauf ist dabei gleichbleibend; nur durch die höhere Trübung des Mediums aufgrund der höheren Fucoidankonzentration wird eine höhere optische Dichte erreicht.



**Abbildung 4.1: Schema des Fructose- und Mannose-Stoffwechsels (KEGG Datenbank (Kanehisa et al., 2010)).** Ziffern geben die EC-Nummern der Enzyme, die die Reaktion durchführen, an.

Ein wichtiger Aspekt war, dass kommerziell verfügbares Fucoidan von *Fucus vesiculosus* (Sigma-Aldrich) ebenfalls als einzige Kohlenstoffquelle genutzt werden konnte, aber nicht das selbstextrahierte Fucoidan von *Laminaria digitata*. Da die Gattung *Fucus* zu der Ordnung der Fucales gehört und die Gattung *Laminaria* zu der Ordnung der Laminariales, kann der Unterschied in der Verwertung von Fucoidan an unterschiedlichen Molekülstrukturen des Fucoidans liegen. Bereits in der Literatur wird erwähnt, dass sich Fucoidane von Braunalgen aus verschiedenen Ordnungen in ihrer Struktur unterscheiden. So liegen bei den Fucoidanen der Ordnung Laminariales hauptsächlich  $\alpha$ -1,3-Fucose-Verknüpfungen und bei den Fucoidanen der Ordnung Fucales alternierende  $\alpha$ -1,3- und  $\alpha$ -1,4-Fucose-Verknüpfungen vor (Cumashi et al., 2007).

Die organischen Stickstoffquellen haben keinen fördernden Einfluss auf das Wachstum. Lediglich der Hefeextrakt in hoher Konzentration unterstützt es. Dies kann auch daran liegen, dass dort weitere Zucker vorhanden sind und somit eine höhere Konzentration an Kohlenstoffquellen oder anderen Zusätzen, wie Mineralien, vorhanden sind, die das Wachstum fördern.

Eine Kultivierung mit Glucose und Co-Substraten zeigt, dass ein geringer Zusatz an Fucoidan das Wachstum deutlich verbessert. Der Vergleich der Kultivierungen ist hierbei schwer, da die Konzentration von Fucoidan nicht quantitativ bestimmt werden kann. Jedoch zeigt sich bei allen Kultivierungen, dass nach Eintritt in die stationäre Phase nicht der gesamte Zucker verbraucht wurde. Daher scheint die stationäre Phase nicht aufgrund von Kohlenstofflimitierung eingeleitet, sondern durch Mangel eines anderen Nährstoffes hervorgerufen zu werden. Das Phänomen, dass die Zucker nicht vollständig verbraucht wurden, konnte bei allen Kultivierungen beobachtet werden (nicht gezeigt), ist jedoch aus der Literatur bekannt (Sakai *et al.*, 2002).

Zusätzlich zum Wachstum wurde auch die Fucoidanase-Aktivität des bakteriellen Isolats MW-C3 untersucht. Dazu wurden die HPLC-GPC (Gelpermeationschromatographie) und die C-PAGE eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass die C-PAGE die sensitivere Methode ist; dabei wird der anionische Charakter des Fucoidans genutzt und es selektiv nachgewiesen. Zusätzlich wurde durch die Färbung mit Alcianblau in Kombination mit Silbernitrat die Sensitivität des Nachweises des Polysaccharids bzw. Oligosaccharids erhöht. Bei der GPC hingegen werden durch den RI-Detektor alle Substanzen, die eine Änderung des Brechungsindex auslösen detektiert. Dies ist sehr hinderlich, da die Versuche größtenteils mit sehr hohen Salzkonzentrationen, welche ebenfalls Peaks im Elugramm auslösen, durchgeführt wurden. Der ebenfalls genutzte Viskositätsdetektor ist allerdings hilfreich, da er nur Signale aufgrund von hoher Viskosität misst. Jedoch kann er nur in Verbindung mit dem RI-Detektor eingesetzt werden, was die beschriebenen Nachteile nicht auszuschließen vermag.

Deshalb wurde die C-PAGE als zuverlässige Methode zur qualitativen Messung der Fucoidanase-Aktivität verwendet. Es wurde ausschließlich die extrazelluläre Enzymaktivität gemessen. Bezüglich der Nutzung von Hefeextrakt als Stickstoffquelle wurde keine Enzymaktivität nachgewiesen, jedoch bei Verwendung von Ammoniumsulfat. Daher wurden anschließend die Enzymaktivitäten nur nach Kultivierung auf anorganischem Stickstoff

untersucht. Eventuell liegt eine Inhibierung der fucoidanverwertenden Enzyme durch den Hefeextrakt oder durch einige Inhaltsstoffe darin vor.

Bei den weiter untersuchten Kohlenhydratquellen stellte sich heraus, dass nur bei Saccharose keine Enzymaktivität nachgewiesen wurde. Die übrigen Monosaccharide bzw. Fucoidan führten offensichtlich zu einem Zuwachs an Fucoidanabbauprodukten. Die Wachstumsphase schien keinen Einfluss auf die Enzymaktivität zu besitzen, da bereits in der anfänglichen Wachstumsphase die Enzymaktivität vorhanden war. Bei den Kultivierungen mit Glucose und Co-Substrat wurde beobachtet, dass die Zugabe von Fucoidan zu einem leichten Anstieg der Enzymaktivität führte.

Das für den Fucoidanabbau verantwortliche Protein sollte über eine SDS-PAGE nachgewiesen werden. Durch die Färbung nach Bradford konnte im Kulturüberstand keine Proteinbande gefunden werden. Erst durch die wesentlich sensitivere Färbung mit Silbernitrat wurden Proteinbanden nachgewiesen.

In Voruntersuchungen wurde für die Anreicherung dieses Proteins eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. In den Fraktionen von 40 % und 60 % konnten Fucoidanabbauprodukte nachgewiesen werden. Die Enzymaktivität konnte keiner Proteinbande zugeordnet werden. Jedoch ist zu sagen, dass die Enzymaktivität extrazellulär vorliegt, was eine Aufreinigung nach der Kultivierung vereinfachen kann.

### **MW-C3: Bioreaktorkultivierung und Untersuchungen zur Fucoidan-Spaltung**

Um eine höhere Menge des fucoidanabbauenden Enzyms zu erhalten, wurde die Kultivierung des Bakteriums in einem Bioreaktor durchgeführt. Der Stamm hat im Bioreaktor eine höhere  $OD_{600}$  erreicht als im Vergleich zu den Kulturen im Schüttelkolben, was für eine Sauerstofflimitierung im Schüttelkolbenmaßstab sprechen kann.

Zudem wurde die Enzymaktivität während der gesamten Kultivierungsdauer kontrolliert und bereits bei Beginn der Kultivierung konnte Enzymaktivität nachgewiesen werden. Dies könnte durch das Inokulum herbeigeführt worden sein. Die Abnahme der Enzymaktivität zur zwölften Stunde korreliert mit dem erhöhten Sauerstoffbedarf des Organismus. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen existiert nicht. Eventuell werden Metabolite gebildet, die das Enzym inhibieren. Mit Fortschreiten der Kultur könnten diese Stoffe wiederum abgebaut werden und das Fucoidanase-Enzym wieder ungehindert arbeiten.

Besonders hervorzuheben ist die Bildung von Banden in der C-PAGE bei diesen Kultivierungen. Dies weist auf Oligosaccharide gleicher Größe oder entsprechenden Masse-/Ladungsverhältnissen hin. Zu Beginn der Kultivierung werden wesentlich kleinere

Oligosaccharide produziert, da der in diesem Fall produzierte Schmier wesentlich weiter im Gel läuft als zur späteren Zeit der Kultur. Es ist daher möglich, dass mehrere Enzyme gebildet werden, die das Fucoidan spalten können. Da die Banden nach der zwölften Stunde gebildet werden, kann auch während dieser Probe mit geringerer Enzymaktivität die Expression von Fucoidan-spaltenden Enzymen umgestellt werden, falls es sich um verschiedene Proteine handeln sollte.

Bei dem zu den *Alteromonadaceae* gehörenden Stamm SN-1009 sind zwei Sequenzen von Fucoidanasen bekannt (Sakai *et al.*, 2002); daher kann es auch im Fall von MW-C3 möglich sein, dass mehrere Proteine für die Spaltung von Fucoidan produziert werden.

Der Vergleich von pH regulierter und unregulierter Bioreaktor-Kultivierung (siehe Anhang) zeigt, dass der pH-Wert kaum Auswirkungen auf den Verlauf des OD<sub>600</sub>-Werts oder Enzymaktivität besitzt.

Das Volumen des Kulturüberstandes konnte mittels Membrantechniken und Ammoniumsulfatfällung auf 50 % eingeeengt werden. Nach der Ultrafiltration (10 kDa) wurde die Enzymaktivität spezifisch im Retentat nachgewiesen. In der Filtratfraktion war sie nicht mehr vorhanden.

Mithilfe der durch die (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Aufkonzentrierung des Kulturüberstandes gewonnenen Enzymlösung wurde eine enzymatische Spaltung des Fucoidans aus *Fucus vesiculosus* durchgeführt. Die C-PAGEs zeigen dabei die Abnahme der Moleküle mit großem Molekulargewicht und eine Zunahme von Oligosacchriden mit geringerem Molekulargewicht. Zusätzlich sieht man, dass die Spaltung des Fucoidans nicht vollständig ist. Denn durch eine Ultrafiltration der Lösung sind Polysaccharide mit einem Molekulargewicht aufkonzentriert worden, die scheinbar größer als 50 kDa sind. Da keine Standards für die C-PAGE vorhanden sind, kann natürlich nicht bestätigt werden, welchem Molekulargewicht diese Polysaccharide entsprechen würden.

Im Retentat konnte noch Fucoidan nachgewiesen werden, das entweder nicht gespalten wurde oder von dem nur kleine Teile abgespalten wurden. Durch die Messung der aufgereinigten Oligosaccharide mithilfe der Infrarotspektroskopie (IR) können Sulfatgruppen im Molekül bestätigt werden. Die durchgeführte Elementaranalyse bestätigt für das Oligosaccharid 2 Sulfatgruppen im Molekül.

Wenn angenommen wird, dass das als Substrat eingesetzte Fucoidan (*Fucus*) ausschließlich aus sulfatierter Fucose besteht, dann sind innerhalb von vier Fucoseeinheiten drei Zuckermoleküle sulfatiert.



Über die Messung des ungespaltenen Fucoidans mithilfe der Gelpermeationschromatographie und dem Einsatz eines Viskositätsdetektors konnte das Molekulargewicht sehr genau bestimmt werden. Prinzipiell gibt es keine geeigneten Standards für Fucoidan für die GPC, da die zur Verfügung stehenden Standards aus neutralen Polysacchariden bestehen. Die normalerweise als Standards verkauften Polysaccharide haben ausnahmslos neutralen Charakter. Da aber die Ladung eines Moleküls das Verhalten der Hydrathülle stark beeinflussen kann, ist hier natürlich eine große Abweichung zu dem tatsächlichen Molekulargewicht möglich. Zudem ist dem Fucoidan kein einzelnes Molekulargewicht zuzuordnen, sondern eine Verteilung verschiedener Molekulargewichte. Trotzdem ist die universelle Kalibrierung für die Bestimmung des Molekulargewichts äußerst hilfreich, auch wenn das System sehr spezifische Voraussetzungen bei der Auslegung der Messung benötigt.

Die Molekulargewichte der isolierten Oligosaccharide sind so gering, dass eine Auswertung nur mit einer Standardkalibrierung durchgeführt werden konnte. Dies führt natürlich auch zu einer Abweichung zum realen Molekulargewicht.

Wenn die Daten von der Elementaranalyse mit der Bestimmung des Molekulargewichts kombiniert werden, kann unter einigen, im folgenden ausgeführten, Annahmen eine Aussage zu der Zusammensetzung der Oligosaccharide getroffen werden. Zu diesen Annahmen zählt, dass das als Substrat genutzte Fucoidan ausschließlich aus sulfatierter Fucose besteht. Dabei besteht ein Verhältnis von Fucose zu Sulfatgruppe von 0,82 bzw. jedes vierte Fucosemolekül ist nicht sulfatiert. So könnte der Peak mit dem Molekulargewicht von 7224 Da aus 27 sulfatierten Fucoseeinheiten und 8 unsulfatierten Fucoseeinheiten bestehen, was einem MW von 7261 Da entspricht. Diesem würde ein molares Verhältnis von Schwefel zu Fucose von 0,77:1 entsprechen und wäre ähnlich zu dem aus der Elementaranalyse bestimmten Verhältnis (siehe Tabelle 3.17). Weitere mögliche Zusammensetzungen der Oligosaccharide sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

**Tabelle 4.1: Mögliche Oligosaccharidzusammensetzungen.**

Probe	Peak	MW (Da)	sulfatierte Fuc: Fuc	errechnetes MW (Da)	Sulfat pro Fucose
Oligosaccharid 1	11	7224	27:8	7261	0,77
	12	1304	5:1	1289	0,83
Oligosaccharid 2	21	1126	4:1	1064	0,80

### 4.3 Vergleich bekannter fucoidanabbauender Bakterien mit dem bakteriellen Isolat MW-C3

Seit dem Jahr 1953, in dem Yaphe und Morgan *Pseudoalteromonas atlantica* und *P. carrageenovora*, die zu der Familie der *Alteromonadaceae* gehören, als fucoidanspaltende Bakterien vorgestellt haben, wurden verschiedene Bakterienstämme mit Fucoidanase-Aktivität beschrieben (Yaphe und Morgan, 1959). Sakai *et al.* haben ebenfalls einen Stamm, SN-1009, dieser Familie isoliert, das Gen isoliert und sequenziert (Sakai *et al.*, 2003b). Eine weitere Arbeitsgruppe hat ähnlich wie Yaphe und Morgan Arten von *Pseudoalteromonas* isoliert und deren Fucoidanase-Aktivität beschrieben (Alexeeva *et al.*, 2002).

Morinaga *et al.*, die die gleiche Isolierungsmethode verwendet haben wie in dieser Arbeit, konnten im Gegensatz dazu keine *Alteromonadaceae*, sondern größtenteils nur *Vibrio* sp. isolieren (Morinaga *et al.*, 1981).

Die zu den *Flavobacteriaceae* gehörenden Organismen *Mesonia algae* und *Maribacter* sp. wurden ebenfalls aufgrund ihrer Fucoidanase-Aktivität isoliert (Nedashkovskaya *et al.*, 2003; Urvantseva *et al.*, 2006). Die Verteilung intrazellulärer Fucoidasen in einer großen Gruppe von Selbstisolaten von *Flavobacteriaceae* wurde beschrieben (Urvantseva *et al.*, 2006). Der einzige weitere charakterisierte Organismus mit einer Sequenz für eine Fucoidanase ist *Mariniflexile fucanivorans*, der ebenfalls zu den *Flavobacteriaceae* gehört (Colin *et al.*, 2006; Descamps *et al.*, 2006).

Die bei der Sequenzierung und Erstellung des phylogenetischen Baums kultivierten Bakterienstämme SA-0082 und CZ1127 gehören ebenfalls zu den *Flavobacteriaceae* und besitzen Fucoidanase-Aktivität (Chang *et al.*, 2010; Sakai *et al.*, 2004). Dies ist besonders interessant, da beide sehr eng mit MW-C3 verwandt sind.

MW-C3 produziert ein oder mehrere extrazelluläre Proteine, die vermutlich endo-spaltende Aktivität besitzen, wie durch die C-PAGE gezeigt worden ist. Der Metabolismus scheint auf die Verwertung von Algenmaterial, insbesondere Mannit und Fucoidan, spezialisiert zu sein. Das Enzym bzw. die Enzyme konnten nicht soweit aufgereinigt werden, dass ein Molekulargewicht bestimmt werden konnte. Ebenso wurde keine spezifische Enzymaktivität bestimmt, da die Analysemethode nicht zu quantitativen Messwerten führt. Die Stabilität konnte ebenso nicht ermittelt werden. Es scheint jedoch, dass das Fucoidan während der Reaktion nicht vollständig umgesetzt wird. Die gebildeten Oligosaccharide konnten auch nicht genau untersucht werden. Es ist anzunehmen, dass es unterschiedliche Produkte mit einer Verteilung der Molekulargewichte gibt. Da die Struktur des Substrats im Detail nicht bekannt ist, könnte die unvollständige Umsetzung des Fucoidans auf variierenden Strukturen

beruhen. Das Isolat MW-C3 verwertete kein Fucoïdan aus *Laminaria digitata*, wenn dies als einzige Kohlenstoffquelle dem Nährmedium zugefügt wurde.

Vergleicht man diese Eigenschaften mit den verwandten Stämmen SA-0082 und CZ1127, die aufgrund der Sequenzidentität der 16S rDNA zu der gleichen Gattung, wenn nicht sogar der gleichen Art zählen könnten, dann können alle drei Stämme fucosehaltige Polysaccharide spalten. Allerdings unterscheiden sie sich bereits in den verwendeten Substraten. Der Stamm CZ1127 verwertet Polysaccharide aus marinen Invertebraten (Chang *et al.*, 2010). Die Enzymaktivität von SA-0082 wurde mit Fucoïdan aus der Braunalge *Kjemanella crassifolia* bestätigt. Er ist zudem in der Lage, Fucoïdan von *Lessonia nigrescens* zu verwerten, die beide der Ordnung der Laminariales angehören. Keine Enzymaktivität besteht bei Substraten aus der Ordnung Fucales. Der Stamm konnte kein Fucoïdan von *Fucus vesiculosus* oder *Ascophyllum nodosum* verwerten (Sakai *et al.*, 2003c).

Alle drei Stämme produzieren wahrscheinlich ein endo-spaltendes Enzym. Eine Übersicht der beschriebenen Charakteristika der Stämme SA-0082, CZ1127 und MW-C3 wird in Tabelle 4.2 präsentiert.

**Tabelle 4.2: Vergleich der phänotypischen und biochemischen Eigenschaften der Stämme SA-0082 (Sakai *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2003d), CZ1127 (Chang *et al.*, 2010) und MW-C3.**  
Auswertung: n.d.: nicht durchgeführt; +: positives Ergebnis; -: negatives Ergebnis

	MW-C3	SA-0082	CZ1127
Zellform	Kurzstäbchen	Kurzstäbchen	
Zellgröße	0,5 x 1,0-1,5 µm	0,8-1,0 x 1,0-1,2 µm	1-2 µm
Gram-Färbung	-	-	-
Wachstum	fakultativ anaerob	aerob	aerob
Medium:			
1 % NaCl	+	-	-
ASW	+	+	+
Oxidase	-	+	+
Katalase	+	+	+
Koloniefarbe	weiß-transparent	gelb	gelb
Fermentation von Glucose	-	+	n.d.
Urease	-	+	n.d.
Indolproduktion	-	-	n.d.
Nitratreduktion	-	-	n.d.
Aesculinhydrolyse	+	+	n.d.
Gelatinhydrolyse	-	+	n.d.
β-Galactosidase	+	-	n.d.
Fucoïdanase	endo	endo	endo
Fucoïdansubstrat	<i>Fucus vesiculosus</i>	Laminariales	<i>Aucadina molpadoides</i>

Das Unvermögen der Isolate MW-C3 und SA-0082, viele der Zucker nicht vollständig verwerten zu können, auch wenn die Kultivierungszeit verlängert wird, ist offensichtlich.

Scheinbar ist die Fähigkeit, Fucoidan abzubauen zu können, innerhalb der Gattung verbreitet. Diese Vermutung müsste mit weiteren verwandten Bakterienstämmen überprüft werden. Da die Bakterien scheinbar nicht nur in Asien sondern auch in Europa gefunden werden können, könnte man annehmen, dass sie in gemäßigtem Klima vorkommen können. Die Untersuchungen des Metabolismus sind bei den anderen Stämmen nicht sehr weit fortgeschritten. Natürlich wäre es gut, vergleichende Untersuchungen anzustellen, um eine bessere Aussage treffen zu können, ob es sich um die gleiche Art handeln könnte oder nur um die gleiche Gattung.

Das Enzym mit Fucoidanase-Aktivität von SA-0082 ist als Lyase bestimmt worden, die Fucoglucomannan spaltet, also keine reinen Fucosepolymereinheiten. Es müsste überprüft werden, ob die Mechanismen aus MW-C3 und CZ1127 ebenfalls der einer Lyase entsprechen oder ob es sich wie bei den anderen Bakterien um eine Hydrolase handelt (Sakai *et al.*, 2003d).

Da alle drei Bakterien in Hinblick auf Fucoidanase-Aktivität isoliert wurden, ist die Frage ob die Enzymaktivität aufgrund der engen verwandtschaftlichen Beziehung vorliegt oder ob es Adaption an eine Umgebung mit fucosehaltigen Polysacchariden ist.

Aufgrund der metabolischen Untersuchungen zu MW-C3, die einen speziellen Stoffwechsel insbesondere aufgrund der stark limitierten Nutzung von Kohlenstoffquellen und der starken Anpassung der Verwertung von Fucose und Mannose, aufzeigten, kann insbesondere die erste Vermutung in Betracht kommen. Allerdings wäre hierzu eine genauere Untersuchung der Stoffwechselwege aller drei Bakterien notwendig.

## 5 Ausblick

Für weitere Untersuchungen wäre es wünschenswert, die enzymatische Aktivität bzgl. des Fucoidanabbaus einem Protein oder mehrerer Proteine zuordnen zu können. Dafür müsste die Enzymlösung in größerem Maßstab, als es bisher möglich war, biotechnologisch hergestellt und chromatographisch aufgereinigt werden. Nach der Aufreinigung könnte die Aminosäuresequenz bestimmt werden. Somit wäre es möglich, auf Genebene die DNA-Sequenz zu bestimmen. Anschließend könnte man durch rekombinante Expression in einem Wirtstamm, z.B. in *E. coli*, den Nachweis erbringen, dass die enzymatische Aktivität zu diesem Protein gehört.

Zudem wäre es wünschenswert, die Produkte der enzymatischen Spaltung des Fucoidans von *Fucus vesiculosus* genauer zu bestimmen. Insbesondere die Struktur und Zusammensetzung der Oligosaccharide von Fucoidan müssten weitergehend untersucht werden.

Das von dem Selbstisolat MW-C3 produzierte Enzym könnte dann entweder durch Optimierung der Wildstamm-Kultivierung oder durch rekombinante Expression produziert und für die Spaltung von Fucoidan eingesetzt werden. Diese Oligosaccharide könnten anschließend für die Untersuchungen von verschiedenen Bioaktivitäten eingesetzt werden. Besonders die antiviralen und antitumoralen Bioaktivitäten, die bereits für das native Fucoidan untersucht wurden, wären als Vergleich wichtig (Holtkamp, 2009).

Desweiteren könnte ein neuartiger Ansatz gewählt werden, um eine Fucoidanase aus der Umwelt zu isolieren. Hierzu könnte die Metagenomanalyse einer marinen Umgebung genutzt werden. Besonders interessant wäre die native Mikrosphäre von Algen oder Küstengewässern (Steele *et al.*, 2009).

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass keine Mikroorganismen direkt kultiviert werden müssten. Zusätzlich würden die Proben nur durch ihre Enzymaktivität ausgewählt werden. Da leider nur eine geringe Anzahl an Gensequenzen von Proteinen mit Fucoidanase-Aktivität vorhanden ist, könnten hierdurch verschiedene Fucoidanasen, die womöglich auch nicht homolog sind, entdeckt werden. Vorteilhaft wäre hier besonders, dass nicht-kultivierbare Mikroorganismen auch berücksichtigt werden können, die ansonsten im Isolations- und Screeningsprozess nicht berücksichtigt würden.

Für eine abschließende Aufklärung von Fucoidanstrukturen speziell für Algenarten, die nicht durch die bekannten Fucoidanasen oder fucoidanspaltenden Mikroorganismen hydrolysiert werden, könnte die beschriebene Isolierungsmethode wiederholt werden, um geeignete Enzyme zu finden.



## 6 Literaturverzeichnis

- Abdel-Fattah A F, Hussein M M-D, & Fouad S T. (1978). Carbohydrates of the brown seaweed *Dictyota dichotoma*. *Phytochemistry*, **17**, 741-743.
- Adhikari U, Mateu C G, Chattopadhyay K, Pujol C A, Damonte E B, & Ray B. (2006). Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytochemistry*, **67**, 2474-2482.
- Ajisaka K, Agawa S, Nagumo S, Kurato K, Yokoyama T, Arai K, & Miyazaki T. (2009). Evaluation and comparison of the antioxidative potency of various carbohydrates using different methods. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **57**, 3102-3107.
- Alexeeva Y V, Ivanova E P, Bakunina I Y, Zvyagintseva T N, & Mikhailov V V. (2002). Optimization of glycosidases production by *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM 3549T. *Letters in Applied Microbiology*, **35**, 343-346.
- Alves A-P, Mulloy B, Diniz J A, & Mourão P A S. (1997). Sulfated Polysaccharides from the Egg Jelly Layer Are Species-specific Inducers of Acrosomal Reaction in Sperms of Sea Urchins. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 6965-6971.
- Alves A-P, Mulloy B, Moy G W, Vacquier V D, & Mourão P A S. (1998). Females of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* differ in the structures of their egg jelly sulfated fucans. *Glycobiology*, **8**, 939-946.
- Andersen R A. (1992). Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity and Conservation*, **1**, 267-292.
- Baba M, Snoeck R, Pauwels R, & de Clercq E. (1988). Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother*, **32**, 1742-1745.
- Bakunina I, Nedashkovskaia O I, Alekseeva S A, Ivanova E P, Romanenko L A, Gorshkova N M, Isakov V V, Zviagintseva T N, & Mikhailov V V. (2002). [Degradation of fucoidan by the marine proteobacterium *Pseudoalteromonas citrea*]. *Mikrobiologiya*, **71**, 49-55.
- Bakunina I, Shevchenko L, Nedashkovskaya O, Shevchenko N, Alekseeva S, Mikhailov V, & Zvyagintseva T. (2000). Screening of marine bacteria for fucoidanases. *Microbiology*, **69**, 303-308.
- Barbeyron T, L'Haridon S, Michel G, & Czjzek M. (2008). *Mariniflexile fucanivorans* sp. nov., a marine member of the Flavobacteriaceae that degrades sulphated fucans from brown algae. *Int J Syst Evol Microbiol*, **58**, 2107-2113.
- Beress A, Wassermann O, Tahhan S, Bruhn T, Beress L, Kraiselburd E N, Gonzalez L V, de Motta G E, & Chavez P I. (1993). A new procedure for the isolation of anti-HIV compounds (polysaccharides and polyphenols) from the marine alga *Fucus vesiculosus*. *J Nat Prod*, **56**, 478-488.
- Bernardet J F, Nakagawa Y, & Holmes B. (2002). Proposed minimal standards for describing new taxa of the family Flavobacteriaceae and emended description of the family. *Int J Syst Evol Microbiol*, **52**, 1049-1070.
- Berrow N S, Bussow K, Coutard B, Diprose J, Ekberg M, Folkers G E, Levy N, Lieu V, Owens R J, et al. (2006). Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study. *Acta Crystallographica Section D*, **62**, 1218-1226.
- Berteau O, McCort I, Goasdoue N, Tissot B, & Daniel R. (2002). Characterization of a new alpha-L-fucosidase isolated from the marine mollusk *Pecten maximus* that catalyzes the hydrolysis of alpha-L-fucose from algal fucoidan (*Ascophyllum nodosum*). *Glycobiology*, **12**, 273-282.

- Berteau O, & Mulloy B. (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*, **13**, 29R-40R.
- Bilan M, Zakharova A, Grachev A, Shashkov A, Nifantiev N, & Usov A. (2007). Polysaccharides of algae: 60. Fucoidan from the pacific brown alga *Analipus japonicus* (Harv.) winne (Ectocarpales, Scytosiphonaceae). *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **33**, 38-46.
- Black W A P. (1954). The seasonal variation in the combined L-fucose content of the common British Laminariaceae and fucaceae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **5**, 445-448.
- Black W A P, Dewar E T, & Woorward F N. (1953). Manufacture of algal chemicals. V.—Laboratory-scale isolation of D-glucose from laminarin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **4**, 58-64.
- Blackwell J R, & Horgan R. (1991). A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Letters*, **295**, 10-12.
- Bochner B R. (2009). Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **33**, 191-205.
- Boisson-Vidal C, Chaubet F, Chevolot L, Siquin C, Theveniaux J, Millet J, Sternberg C, Mulloy B, & Fischer A M. (2000). Relationship between antithrombotic activities of fucans and their structure. *Drug Development Research*, **51**, 216-224.
- Brawley S H, & Quatrano R S. (1979). Sulfation of fucoidin in *Fucus* embryos: IV. Autoradiographic investigations of fucoidin sulfation and secretion during differentiation and the effect of cytochalasin treatment. *Developmental Biology*, **73**, 193-205.
- Bui M L, Ngo Q B, Nguyen D N, Pham D T, & Tran T T V. (2005). Studies on Fucoidan and its Production from Vietnamese Brown Seaweeds. *ASEAN Journal on Science and Technology for Development*, **22**, 371-380.
- Callow M E, Coughlan S J, & Evans L V. (1978). The role of Golgi bodies in polysaccharide sulphation in *Fucus* zygotes. *Journal of Cell Science*, **32**, 337-356.
- Campo V L, Kawano D F, Silva Jr D B d, & Carvalho I. (2009). Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - A review. *Carbohydrate Polymers*, **77**, 167-180.
- Cantarel B, Coutinho P, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, & Henrissat B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. Searched on 18. Juli 2011
- Chance R R, Baniukiewicz S P, Mintz D, Strate G V, & Hadjichristidis N. (1995). Characterization of Low-Molecular-Weight Polymers: Failure of Universal Calibration in Size Exclusion Chromatography. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, **1**, 3 - 34.
- Chandía N P, & Matsuhira B. (2008). Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, **42**, 235-240.
- Chang Y, Xue C, Tang Q, Li D, Wu X, & Wang J. (2010). Isolation and characterization of a sea cucumber fucoidan-utilizing marine bacterium. *Letters in Applied Microbiology*, **50**, 301-307.
- Chattopadhyay N, Ghosh T, Sinha S, Chattopadhyay K, Karmakar P, & Ray B. (2010). Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: Structural features and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, **118**, 823-829.
- Chengkui Z, Tseng C K, Junfu Z, & Chang C F. (1984). Chinese seaweeds in herbal medicine. *Hydrobiologia*, **116-117**, 152-154.



- Chevolot L, Foucault A, Chaubet F, Kervarec N, Sinquin C, Fisher A-M, & Boisson-Vidal C. (1999). Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. *Carbohydrate Research*, **319**, 154-165.
- Chizhov A O, Dell A, Morris H R, Haslam S M, McDowell R A, Shashkov A S, Nifant'ev N E, Khatuntseva E A, & Usov A I. (1999). A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydrate Research*, **320**, 108-119.
- Churms S C. (1996). Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on size exclusion. *Journal of Chromatography A*, **720**, 151-166.
- Cock J M, Sterck L, Rouze P, Scornet D, Allen A E, Amoutzias G, Anthouard V, Artiguenave F, Aury J-M, *et al.* (2010). The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*, **465**, 617-621.
- Cole J R, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris R J, Kulam-Syed-Mohideen A S, McGarrell D M, Marsh T, *et al.* (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, **37**, D141-D145.
- Colin S, Deniaud E, Jam M, Descamps V, Chevolot Y, Kervarec N, Yvin J-C, Barbeyron T, Michel G, *et al.* (2006). Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans. *Glycobiology*, **16**, 1021-1032.
- Cumashi A, Ushakova N A, Preobrazhenskaya M E, D'Incecco A, Piccoli A, Totani L, Tinari N, Morozevich G E, Berman A E, *et al.* (2007). A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, **17**, 541-552.
- Daniel R, Berteau O, Jozefonvicz J, & Goasdoue N. (1999). Degradation of algal (*Ascophyllum nodosum*) fucoidan by an enzymatic activity contained in digestive glands of the marine mollusc *Pecten maximus*. *Carbohydrate Research*, **322**, 291-297.
- Descamps V, Colin S, Lahaye M, Jam M, Richard C, Potin P, Barbeyron T, Yvin J C, & Kloareg B. (2006). Isolation and culture of a marine bacterium degrading the sulfated fucans from marine brown algae. *Mar Biotechnol (NY)*, **8**, 27-39.
- Doh-ura K, Kuge T, Uomoto M, Nishizawa K, Kawasaki Y, & Iha M. (2007). Prophylactic Effect of Dietary Seaweed Fucoidan against Enteral Prion Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 2274-2277.
- Evans L V, Simpson M, & Callow M E. (1973). Sulphated polysaccharide synthesis in brown algae. *Planta*, **110**, 237-252.
- Fishman M L, Gillespie D T, Sondney S M, & El-Atawy Y S. (1991). Intrinsic viscosity and molecular weight of pectin components. *Carbohydrate Research*, **215**, 91-104.
- Fitton J H. (2003). Brown Marine Algae: A Survey of Therapeutic Potentials. *Alternative and Complementary Therapies*, **9**, 29-33.
- Fu X T, & Kim S M. (2010). Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. *Mar Drugs*, **8**, 200-218.
- Furukawa S-i, Fujikawa T, Koga D, & Ide A. (1992). Purification and Some Properties of Exo-type Fucoidanases from *Vibrio* sp. N-5. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **56**, 1829-1834.
- Gacesa P. (1988). Alginates. *Carbohydrate Polymers*, **8**, 161-182.
- Gideon T P, & Rengasamy R. (2008). Toxicological Evaluation of Fucoidan from *Cladosiphon okamuranus*. *Journal of Medicinal Food*, **11**, 638-642.
- Guiry M D, & Guiry G M. (2011). AlgaeBase. from National University of Ireland, Galway <http://www.algaebase.org> Searched on 20 June 2011
- Hidari K I, Takahashi N, Arihara M, Nagaoka M, Morita K, & Suzuki T. (2008). Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Biochem Biophys Res Commun*, **376**, 91-95.

- Hoffmann F, Heuvel J v d, Zidek N, & Rinas U. (2004). Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. *Enzyme and Microbial Technology*, **34**, 235-241.
- Holtkamp A D. (2009). *Isolation, Characterization, Modification and Application of Fucoidan from Fucus vesiculosus*. PhD Thesis, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Holtkamp A D, Kelly S, Ulber R, & Lang S. (2009). Fucoidans and fucoidanases--focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, **82**, 1-11.
- Kanehisa M, Goto S, Furumichi M, Tanabe M, & Hirakawa M. (2010). KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, **38**, D355-D360.
- Karmakar P, Pujol C A, Damonte E B, Ghosh T, & Ray B. (2010). Polysaccharides from *Padina tetrastrum*: Structural features, chemical modification and antiviral activity. *Carbohydrate Polymers*, **80**, 513-520.
- Kim W J, Kim S M, Lee Y H, Kim H G, Kim H K, Moon S H, Suh H H, Jang K H, & Park Y I. (2008). Isolation and characterization of marine bacterial strain degrading fucoidan from Korean *Undaria pinnatifida* Sporophylls. *J Microbiol Biotechnol*, **18**, 616-623.
- Kitamikado M, Yamaguchi K, Tseng C-H, & Okabe B I. (1990). Method Designed To Detect Alginate-Degrading Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2939-2940.
- Kitamura K, Matsuo M, & Yasui T. (1992). Enzymic Degradation of Fucoidan by Fucoidanase from the Hepatopancreas of *Patinopekten yessoensis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **56**, 490-494.
- Kostanski L K, Keller D M, & Hamielec A E. (2004). Size-exclusion chromatography--a review of calibration methodologies. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **58**, 159-186.
- Kusaikin M I, Chizhov A O, Alekseeva S A, Bakunina I Y, Nedashkovskaya O I, Sova V V, Zvyagintseva T N, & Elyakov G B. (2004). A comparative study of the specificity of fucoidanases of marine microorganisms and invertebrates. *Dokl Biochem Biophys*, **396**, 187-189.
- Kusaykin M, Bakunina I, Sova V, Ermakova S, Kuznetsova T, Besednova N, Zaporozhets T, & Zvyagintseva T. (2008). Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds. *Biotechnol J*, **3**, 904-915.
- Kylin H. (1913). Zur Biochemie der Meeresalgen. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **83**, 171-197.
- Lee J, Kim J, Moon C, Kim S-H, Hyun J W, Park J W, & Shin T. (2008). Radioprotective effects of fucoidan in mice treated with total body irradiation. *Phytotherapy Research*, **22**, 1677-1681.
- Leite E L, Medeiros M G L, Rocha H A O, Farias G G M, da Silva L F, Chavante S F, de Abreu L D, Dietrich C P, & Nader H B. (1998). Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schröederi*. *Plant Science*, **132**, 215-228.
- Leung M Y K, Liu C, Koon J C M, & Fung K P. (2006). Polysaccharide biological response modifiers. *Immunol. Lett.*, **105**, 101-114.
- Li B, Wei X-J, Sun J-L, & Xu S-Y. (2006). Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme*. *Carbohydrate Research*, **341**, 1135-1146.
- Li N, Zhang Q, & Song J. (2005). Toxicological evaluation of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, **43**, 421-426.

- Mabeau S, & Kloareg B. (1987). Isolation and Analysis of the Cell Walls of Brown Algae: *Fucus spiralis*, *F. ceranoides*, *F. vesiculosus*, *F. serratus*, *Bifurcaria bifurcata* and *Laminaria digitata*. *Journal of Experimental Botany*, **38**, 1573-1580.
- Mandal P, Mateu C G, Chattopadhyay K, Pujol C A, Damonte E B, & Ray B. (2007). Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. *Antivir Chem Chemother*, **18**, 153-162.
- McHugh D J. (2003). A Guide to the Seaweed Industry. No. 441, 105.
- McNeely W. (1959). Fucoidan. In R. Whitsler & J. BeMiller (Eds.), *Industrial Gums - Polysaccharides and Their Derivatives* (pp. 117-121). New York: Academic Press.
- Mian A J, & Percival E. (1973). Carbohydrates of the brown seaweeds *Himanthalia lorea*, *Bifurcaria bifurcata*, and *Padina pavonia* : Part I. extraction and fractionation. *Carbohydrate Research*, **26**, 133-146.
- Michel G, Tonon T, Scornet D, Cock J M, & Kloareg B. (2010). The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytologist*, **188**, 82-97.
- Miller G L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, **31**, 426-428.
- Mizuno M, Nishitani Y, Tanoue T, Matoba Y, Ojima T, Hashimoto T, & Kanazawa K. (2009). Quantification and Localization of Fucoidan in *Laminaria japonica* Using a Novel Antibody. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **73**, 335-338.
- Morinaga T, Araki T, Ito M, & Kitamikado M. (1981). A Search for Fucoidan-Degrading Bacteria in Coastal Sea Environments of Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **47**, 621-625.
- Nedashkovskaya O I, Kim S B, Han S K, Lysenko A M, Rohde M, Zhukova N V, Falsen E, Frolova G M, Mikhailov V V, et al. (2003). *Mesonionia algae* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from the green alga *Acrosiphonia sonderi* (Kütz.) Kornm. *Int J Syst Evol Microbiol*, **53**, 1967-1971.
- Nishino T, & Nagumo T. (1992). Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. *Carbohydrate Research*, **229**, 355-362.
- Obluchinskaya E. (2008). Comparative chemical composition of the Barents Sea brown algae. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **44**, 305-309.
- Ohshiro T, Ohmoto Y, Ono Y, Ohkita R, Miki Y, Kawamoto H, & Izumi Y. (2010). Isolation and characterization of a novel fucoidan-degrading microorganism. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**, 1729-1732.
- Ouano A C. (1972). Gel-permeation chromatography. VII. Molecular weight detection of GPC effluents. *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry*, **10**, 2169-2180.
- Ouano A C. (1973). Quantitative Data Interpretation Techniques in Gel Permeation Chromatography. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, **9**, 123-148.
- Patankar M S, Oehninger S, Barnett T, Williams R L, & Clark G F. (1993). A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 21770-21776.
- Pereira M S, Mulloy B, & Mourão P A S. (1999). Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Fucans. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 7656-7667.
- Peters A F, Marie D, Scornet D, Kloareg B, & Mark Cock J. (2004). Proposal of *Ectocarpus Siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) as a Model Organism for Brown Algal Genetics and Genomics. *Journal of Phycology*, **40**, 1079-1088.
- Phillips N, Burrowes R, Rousseau F, De Reviers B, & Saunders G W. (2008). Resolving Evolutionary Relationships Among the Brown Algae Using Chloroplast and Nuclear Genes. *Journal of Phycology*, **44**, 394-405.

- Pomin V H, & Mourao P A. (2008). Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. *Glycobiology*, **18**, 1016-1027.
- Pomin V H, & Mourão P A S. (2008). Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. *Glycobiology*, **18**, 1016-1027.
- Pomin V H, Valente A P, Pereira M S, & Mourão P A S. (2005). Mild acid hydrolysis of sulfated fucans: a selective 2-desulfation reaction and an alternative approach for preparing tailored sulfated oligosaccharides. *Glycobiology*, **15**, 1376-1385.
- Preeprame S, Hayashi K, Lee J B, Sankawa U, & Hayashi T. (2001). A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **49**, 484-485.
- Qiu X, Amarasekara A, & Doctor V. (2006). Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of fucoidan. *Carbohydrate Polymers*, **63**, 224-228.
- Ribeiro A-C, Vieira R P, Mourão P A S, & Mulloy B. (1994). A sulfated [ $\alpha$ ]-l-fucan from sea cucumber. *Carbohydrate Research*, **255**, 225-240.
- Richardson D J, & Watmough N J. (1999). Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 207-219.
- Rioux L-E, Turgeon S L, & Beaulieu M. (2007). Rheological characterisation of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**, 1630-1638.
- Rocha de Souza M, Marques C, Guerra Dore C, Ferreira da Silva F, Oliveira Rocha H, & Leite E. (2007). Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, **19**, 153-160.
- Sakai T, Ishizuka K, & Kato I. (2003a). Isolation and Characterization of a Fucoidan-Degrading Marine Bacterium. *Marine Biotechnology*, **5**, 409-416.
- Sakai T, Ishizuka K, Shimanaka K, Ikai K, & Kato I. (2003b). Structures of Oligosaccharides Derived from *Cladosiphon okamuranus* Fucoidan by Digestion with Marine Bacterial Enzymes. *Marine Biotechnology*, **5**, 536-544.
- Sakai T, Kawai T, & Kato I. (2004). Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterial strain and its fucoidanase. *Mar Biotechnol (NY)*, **6**, 335-346.
- Sakai T, Kimura H, & Kato I. (2002). A marine strain of flavobacteriaceae utilizes brown seaweed fucoidan. *Mar Biotechnol (NY)*, **4**, 399-405.
- Sakai T, Kimura H, & Kato I. (2003c). Purification of Sulfated Fucoglucuronomannan Lyase from Bacterial Strain of *Fucobacter marina* and Study of Appropriate Conditions for Its Enzyme Digestion. *Marine Biotechnology*, **5**, 380-387.
- Sakai T, Kimura H, Kojima K, Shimanaka K, Ikai K, & Kato I. (2003d). Marine Bacterial Sulfated Fucoglucuronomannan (SFGM) Lyase Digests Brown Algal SFGM into Trisaccharides. *Marine Biotechnology*, **5**, 70-78.
- Sanger F, Nicklen S, & Coulson A R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74**, 5463-5467.
- Schweiger R G. (1962). Methanolysis of Fucoidan. I. Preparation of Methyl  $\alpha$ -L-Fucoside and L-Fucose. *The Journal of Organic Chemistry*, **27**, 4267-4269.
- Sekowska A, Kung H-F, & Danchin A. (2002). Sulfur Metabolism in *Eschericia coli*: Facts and Fiction. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **2**, 145-177.
- Sezer A D, Cevher E, Hatipoğlu F, Urtan Z, Ba, Levent A, Akbu, *et al.* (2008). Preparation of Fucoidan-Chitosan Hydrogel and Its Application as Burn Healing Accelerator on Rabbits. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **31**, 2326-2333.
- Shibata H, Imuro M, Uchiya N, Kawamori T, Nagaoka M, Ueyama S, Hashimoto S, Yokokura T, Sugimura T, *et al.* (2003). Preventive Effects of Cladosiphon Fucoidan Against *Helicobacter pylori* Infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter*, **8**, 59-65.

- Sinha S, Astani A, Ghosh T, Schnitzler P, & Ray B. (2010). Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: structural features, chemical modification and anti-viral activity. *Phytochemistry*, **71**, 235-242.
- Sørensen H P, & Mortensen K K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, **115**, 113-128.
- Steele H L, Jaeger K E, Daniel R, & Streit W R. (2009). Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 25-37.
- Sun T, Chance R R, Graessley W W, & Lohse D J. (2004). A Study of the Separation Principle in Size Exclusion Chromatography. *Macromolecules*, **37**, 4304-4312.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, & Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739.
- Tanaka K, & Sorai S. (1970). Hydrolysis of fucoidan by abalone liver [ $\alpha$ ]-L-fucosidase. *FEBS Letters*, **9**, 45-48.
- Tindall B J, Rosselló-Móra R, Busse H-J, Ludwig W, & Kämpfer P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **60**, 249-266.
- Trinchero J, Ponce N M A, Córdoba O L, Flores M L, Pampuro S, Stortz C A, Salomón H, & Turk G. (2009). Antiretroviral activity of fucoidans extracted from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*. *Phytotherapy Research*, **23**, 707-712.
- Umbarger H E. (1978). Amino Acid Biosynthesis and Its Regulation. *Ann Rev Biochem*, **47**, 533-606.
- Urvantseva A M, Bakunina I, Nedashkovskaia O I, Kim S B, & Zviagintseva T N. (2006). [Distribution of intracellular fucoidan hydrolases among marine bacteria of the family Flavobacteriaceae]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, **42**, 552-559.
- Usov A I, Smirnova G P, & Klochkova N G. (2001). Polysaccharides of Algae: 55. Polysaccharide Composition of Several Brown Algae from Kamchatka. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **27**, 395-399.
- Vilela-Silva A-C E S, Alves A-P, Valente A-P, Vacquier V D, & Mourão P A S. (1999). Structure of the sulfated  $\alpha$ -L-fucan from the egg jelly coat of the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: patterns of preferential 2-O- and 4-O-sulfation determine sperm cell recognition. *Glycobiology*, **9**, 927-933.
- Vilela-Silva A-C E S, Castro M O, Valente A-P, Biermann C H, & Mourão P A S. (2002). Sulfated Fucans from the Egg Jellies of the Closely Related Sea Urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* Ensure Species-specific Fertilization. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 379-387.
- Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Song H, & Li P. (2010). Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol*, **46**, 6-12.
- Wong T Y, Preston L A, & Schiller N L. (2000). Alginate Lyase: Review of Major Sources and Enzyme Characteristics, Structure-Function Analysis, Biological Roles, and Applications. *Annual Review of Microbiology*, **54**, 289-340.
- Yamaguchi T, Ikawa T, & Nisizawa K. (1969). Pathway of mannitol formation during photosynthesis in brown algae. *Plant and Cell Physiology*, **10**, 425-440.
- Yamamoto I, Takahashi M, Tamura E, Maruyama H, & Mori H. (1984). Antitumor activity of edible marine algae: Effect of crude fucoidan fractions prepared from edible brown seaweeds against L-1210 leukemia. *Hydrobiologia*, **116-117**, 145-148.
- Yamori Y, Miura A, & Taira K. (2001). Implications from and for food cultures for cardiovascular diseases: Japanese food, particularly Okinawan diets. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, **10**, 144-145.

- Yang C, Chung D, Shin I-S, Lee H, Kim J, Lee Y, & You S. (2008). Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **43**, 433-437.
- Yaphe W, & Morgan K. (1959). Enzymic Hydrolysis of Fucoidin by *Pseudomonas atlantica* and *Pseudomonas carrageenovora*. *Nature*, **183**, 761-762.
- Ye J, Li Y, Teruya K, Katakura Y, Ichikawa A, Eto H, Hosoi M, Nishimoto S, & Shirahata S. (2005). Enzyme-digested Fucoidan Extracts Derived from Seaweed Mozuku of *Cladosiphon novae-caledoniae* kylin Inhibit Invasion and Angiogenesis of Tumor Cells. *Cytotechnology*, **47**, 117-126.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, & Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*, **7**, 203-214.
- Ziervogel K, & Arnosti C. (2008). Polysaccharide hydrolysis in aggregates and free enzyme activity in aggregate-free seawater from the north-eastern Gulf of Mexico. *Environ. Microbiol.*, **10**, 289-299.
- Zvyagintseva T N, Shevchenko N M, Nazarova I V, Scobun A S, Luk'yanov P A, & Elyakova L A. (2000). Inhibition of complement activation by water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **126**, 209-215.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampicillin, Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASW	<i>artificial sea water</i> , Künstliches Meerwasser
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bla	β-Lactamase
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i> , Alkalische Phosphatase
C-PAGE	<i>Carbohydrate</i> -PAGE, Kohlenhydrat-PAGE
Da	Dalton
dest. H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNS	Dinitrosalicylsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraacetat
f	<i>forward</i> , vorwärts
G	Glucose
g	Gramm
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
k	kilo
K	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
log	Logarithmus
m	milli
M	molar, Mega-
MB	<i>Marine Broth</i> , Meerwassermedium
min	Minute
MW	Meerwassermedium, Molekulargewicht
n	nano
N	Normal
NBT	Nitroblautetrazolium
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
ORI	<i>origin of replication</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pelB	Signalpeptidsequenz zum Transport des Proteins in das Periplasma
pET	Plasmid für Expression durch T7 RNA Polymerase
r	<i>reverse</i> , rückwärts
rpm	<i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SOC	<i>Super optimal broth with catabolic repression</i> , Medium für Transformation
Tab.	Tabelle
sp.	<i>species</i>
spp.	<i>species</i>
T	Tween20
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TB	Toluidin Blue
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TFB	<i>Transformation buffer</i> , Transformationspuffer
TMB	Tetramethylbenzidin
TY	<i>Trypton yeast broth</i> , Trypton-Hefe-Medium
U	Unit, Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume to volume</i> , Volumenprozent
w/v	<i>weight to volume</i> , Gewichtsprozent
x g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung
μ	mikro



## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Braunalgen, aus denen bereits Fucoidan extrahiert wurde, erweitert nach (Berteau und Mulloy, 2003) .....	6
Tabelle 1.2: Auflistung der Arten mit beschriebenen Fucanen aus tierischen Meeresbewohnern .....	11
Tabelle 1.3: Übersicht Fucoidanaseproduzierender Mikroorganismen, erweitert nach Holtkamp <i>et al.</i> (2009) und Kusaykin <i>et al.</i> (2008) .....	16
Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme .....	24
Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide .....	24
Tabelle 2.3: Eingesetzte Enzyme .....	24
Tabelle 2.4: Verwendete Antikörper .....	25
Tabelle 2.5: eingesetzte Oligonucleotide .....	25
Tabelle 2.6: Eingesetzte Puffer und Lösungen .....	25
Tabelle 2.7: Verwendete Kit-Systeme .....	27
Tabelle 2.8: Auflistung der verwendeten Laborgeräte und weiterem Zubehör .....	27
Tabelle 2.9: Auflistung von verwendeten Computerprogrammen .....	28
Tabelle 2.10: Verwendete Zusätze von 2 x TY-Medium .....	28
Tabelle 2.11: Rezept für Artificial Seawater (ASW) .....	29
Tabelle 2.12: Rezept Vitaminlösung .....	29
Tabelle 2.13: Spurenelement-Lösung .....	30
Tabelle 2.14: Rezept EDTA-Lösung .....	30
Tabelle 2.15: Zusätze für ASW .....	30
Tabelle 2.16: Rezept für die Medienbestandteile Basic A und Basic B .....	30
Tabelle 2.17: Parameter für die Bioreaktorkultivierung .....	33
Tabelle 2.18: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Temperaturverlauf der PCR für die Amplifikation der Fucoidanase <i>fcnA</i> aus genomischer DNA von <i>Mariniflexile fucanivorans</i> .....	35
Tabelle 2.19: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Temperaturverlauf der Kolonie-PCR für die Überprüfung der erfolgreichen Klonierung der Fucoidanase <i>fcnA</i> .....	36
Tabelle 2.20: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes .....	37
Tabelle 2.21: Zusammensetzung und Temperaturverlauf eines Sequenzier-Ansatzes .....	37
Tabelle 2.22: Zusammensetzung für SDS-PAA-Gele .....	39
Tabelle 2.23: Verschiedene Medien für die Isolierung mariner Mikroorganismen .....	41
Tabelle 2.24: Zusammensetzung der Medien für Biolog® PM 1 und PM 2A MicroPlate™ .....	43
Kohlenstoffverwendung .....	43
Tabelle 2.25: Zusammensetzung C-PAGE .....	46
Tabelle 2.26: Auflistung der Geräte für HPLC-GPC .....	46
Tabelle 2.27: Parameter für Messungen mit HPLC-GPC .....	47
Tabelle 3.1: Randbedingungen für die Expressionsanalyse von pET21a(+)- <i>fcnA</i> . .....	52
Tabelle 3.2: Basenfolge des Vektors im Bereich des Übergangs von <i>pelB</i> -Leadersequenz zum Gen <i>fcnA</i> ; <i>pelB</i> -Leadersequenz, Restriktionsstelle, <u>zusätzliche Basen</u> , Anfangssequenz <i>fcnA</i> . .....	53
Tabelle 3.3: Übersicht der durchgeführten Ligationsansätze von pET21a(+) mit <i>fcnA</i> ; .....	54
Tabelle 3.4: Expressionsanalyse von <i>E. coli</i> BLR(DE3)-pET21a(+) <i>pelB-fcnA</i> mit Variation der IPTG-Konzentration und der Expressionstemperatur. ....	55
Tabelle 3.5: Liste der selbstisolierten Mikroorganismen aus Wilhelmshaven .....	58
Tabelle 3.6: Einfluss verschiedener Kohlenhydrate bzw. von Fucoidan auf das Wachstum von marinen Isolat. ....	59
Tabelle 3.7: Übersicht einiger phänotypischer Eigenschaften von MW-C3 .....	64

Tabelle 3.8: Übersicht einiger biochemischer Eigenschaften ermittelt durch API Testsysteme.	65
Tabelle 3.9: Wichtige verwertete Kohlenstoffquellen des Isolats MW-C3	66
Tabelle 3.10: Wichtige verwertete Stickstoffquellen des Isolats MW-C3	66
Tabelle 3.11: Wichtige verwertete Phosphatquellen des Isolats MW-C3	67
Tabelle 3.12: Wichtigste verwertete Sulfatquellen des Isolats MW-C3	67
Tabelle 3.13: Untersuchte Fucoidane als Kohlenstoffquelle für MW-C3.	70
Tabelle 3.14: Numerische Auswertung der Co-Kultivierung von MW-C3.	73
Tabelle 3.15: Qualitative Bewertung der Fucoidanase-Aktivität von MW-C3-Kulturen in Abhängigkeit von der C-Quelle sowie der Kultivierungszeit.	80
Tabelle 3.16: Aufarbeitung des Kulturüberstandes (Bioreaktor).	86
Tabelle 3.17: Elementaranalyse verschiedener Fucoidanproben. [TU Braunschweig, Institut f. Pharmazeutische Chemie]	89
Tabelle 3.18: Übersicht der Molekulargewichte des Fucoidans und dessen Oligosaccharide aus der enzymatischen Hydrolyse.	91
Tabelle 4.1: Mögliche Oligosaccharidzusammensetzungen.	105
Tabelle 4.2: Vergleich der phänotypischen und biochemischen Eigenschaften der Stämme SA-0082 (Sakai <i>et al.</i> , 2002; Sakai <i>et al.</i> , 2003d), CZ1127 (Chang <i>et al.</i> , 2010) und MW-C3.	107
Tabelle 10.1: Messdaten Elementaranalyse Fucoidan ( <i>Fucus vesiculosus</i> ) in Dreifachbestimmung [TU Braunschweig, Institut für Pharmazeutische Chemie]	XVI
Tabelle 10.2: Messdaten Elementaranalyse Fucoidan ( <i>Laminaria digitata</i> ) in Dreifachbestimmung [TU Braunschweig, Institut für Pharmazeutische Chemie]	XVI
Tabelle 10.3: verwandte Typstämme von MW-C3 auf Basis von Datenbanksuche ( <a href="http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp">http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp</a> )	XVII
Tabelle 10.4: Verwandte Stämme von MW-C3 auf Basis von Datenbanksuche ( <a href="http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp">http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp</a> )	XVII
Tabelle 10.5: Übersicht der Nachweisreaktionen von AP 20 NE Teststreifen	XVIII
Tabelle 10.6: Übersicht der Nachweisreaktionen von API ZYM Teststreifen	XVIII

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Struktur von Agarose, einem Bestandteil des Agars (Fu und Kim, 2010).....	2
Abbildung 1.2: Monomereinheiten von Alginat: $\alpha$ -L-Guluronat (G) und $\beta$ -D-Mannuronat (M) (Gacesa, 1988).....	2
Abbildung 1.3: Disaccharid-Strukturmotive der vorhandenen Carrageenan-Varianten (Campo <i>et al.</i> , 2009).....	4
Abbildung 1.4: Strukturen von Fucoidan aus verschiedenen Braunalgenarten (Cumashi <i>et al.</i> , 2007).....	8
Abbildung 1.5: Darstellung der Zellwand von Braunalgen (Michel <i>et al.</i> , 2010).....	10
Abbildung 1.6: Strukturen von Fucanen aus marinen Invertebraten (Pomin und Mourão, 2008).....	12
Abbildung 1.7: Typisches Elugramm einer GPC; Antwort eines Konzentrationsmessenden Detektor über dem Elutionsvolumen der Probe (engverteilter Pullulanstandard $M_w$ : 13200 Da).....	20
Abbildung 1.8: Semilogarithmische Auftragung des Elutionsvolumen V über dem Molekulargewicht M nach der Formel $V = V_0 + V_P \exp(-kM)$ , wenn $V_0 = V_P = 20$ ml und $k = 10^{-5}$ .....	21
Abbildung 2.1: Blasentang ( <i>Fucus vesiculosus</i> ) wachsend an einer Buhne, Wilhelmshaven .	31
Abbildung 3.1: SDS-PAGE einer Expression der Fucoidanase <i>fcnA</i> in <i>E.coli</i> BLR(DE3). ....	51
Abbildung 3.2: Western Blot des Pellets der Kultivierung von <i>E. coli</i> BLR(DE3)-pET21a(+)- <i>fcnA</i> . ....	52
Abbildung 3.3: Darstellung des Vektors pET21a(+)- <i>pelB-fcnA</i> . Gezeigt sind das Gen <i>fcnA</i> sowie die Erkennungsstellen für die Restriktionsendonuklease (RE-Stellen) und das <i>bla</i> -Gen für die Ampicillin-Resistenz.....	54
Abbildung 3.4: Abbildung des Western Blots der Kultivierung von <i>E. coli</i> BLR(DE3)-pET21a(+)- <i>pelB-fcnA</i> . ....	55
Abbildung 3.5: Western Blot der Aufreinigungsfractionen. ....	56
Abbildung 3.6: Schema der Isolierung von fucoidanabbauenden Mikroorganismen .....	57
Abbildung 3.7: Einfluss von Vorkultur und verschiedenen Zusätzen auf das Wachstum von MW-C3. Bedingung: 20 ml Schüttelkulturen; ASW-Medium: Fucoidan (1 g/l) mit Natriumnitrat (0,549 mM); Anfangs-pH7,4, 25 °C, 150 rpm; verschiedenen Zusätze und unterschiedlichem Inokulum (ASW + Fucoidan (1 g/l) + Natriumnitrat (0,549 mM) oder MB2 + Fucoidan (1 g/l))......	60
Abbildung 3.8: Verwandtschaft von Typstämmen aus der Familie der <i>Flavobacteriaceae</i> mit MW-C3. Alignment mit ClustalW und Konstruktion des phylogenetischen Stammbaums mittels Neighbour-joining Methode und <i>Mariniflexile fucanivorans</i> als Außengruppierung. .	62
Abbildung 3.9: Verwandtschaft von isolierten Stämmen aus der Ordnung der <i>Flavobacteriaceae</i> mit MW-C3. Alignment mit ClustalW und Konstruktion des phylogenetischen Stammbaums mittels Neighbour-joining Methode und <i>Mariniflexile fucanivorans</i> als Außengruppierung. ....	63
Abbildung 3.10: Mikroskopische Aufnahme von MW-C3 (200x Vergrößerung). ....	64
Abbildung 3.11: Abbildung der PM4-Platte nach 72 h Inkubation von MW-C3 im Omnilog® bei 25°C. Well A1: Negativ-Kontrolle, blau-violette Färbung: positive Verwertung des Inhaltsstoffes.....	65
Abbildung 3.12: Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Wachstum des Selbstisolats MW-C3 in künstlichem Meerwasser. ....	68
Abbildung 3.13: Einfluss der Fucoidankonzentration auf das Wachstum von MW-C3. ....	69
Abbildung 3.14: Einfluss verschiedener Stickstoffquellen auf die maximal erreichten OD <sub>600</sub> -Werte bei Kultivierung von MW-C3.....	71

Abbildung 3.15: Co-Kultivierungen von MW-C3 auf Glucose (5g/l) mit Fucoidan oder Fucose als Co-Substrat.....	72
Abbildung 3.16: Einfluss der Temperature auf das Wachstum von MW-C3.....	73
Abbildung 3.17: Einfluss des pH-Werts auf das Wachstum von MW-C3.....	74
Abbildung 3.18: Elugramm (RI-Detektor) der enzymatischen Umsetzung von Fucoidan aus <i>Fucus vesiculosus</i> für die Stunden 0-113.....	75
Abbildung 3.19: Ausschnitt des Fucoidanpeaks aus dem Elugramm (RI-Detektor) der enzymatischen Umsetzung von Fucoidan aus <i>Fucus vesiculosus</i> .....	76
Abbildung 3.20: Elugramm (Viskositätsdetektor) der enzymatischen Umsetzung von Fucoidan aus <i>Fucus vesiculosus</i> für die Stunden 0-113.....	76
Abbildung 3.21: Elugramm des Enzymaktivitätstests mit subtrahierten Peakdaten der eingesetzten Enzymlösung.....	77
Abbildung 3.22: C-PAGE der zeitlichen Abhängigkeit der Produktion von Oligosacchariden aus extrazellulärer Enzymlösung.....	78
Abbildung 3.23: C-PAGE der zeitlichen Abhängigkeit der Produktion von Oligosacchariden aus intrazellulärer Enzymlösung.....	78
Abbildung 3.24: C-PAGE des Enzymaktivitätstests nach Wachstum auf Fucoidan und Hefeextrakt.....	79
Abbildung 3.25: C-PAGE des Enzymaktivitätstests von Glucose, Mannose, Saccharose und Xylose in der stationäre Phase des Wachstums.....	80
Abbildung 3.26: C-PAGE des Enzymaktivitätstests Glucose + Co-Substrate.....	81
Abbildung 3.27: SDS-PAGE bzgl. der Proteine aus Kulturüberständen (Schüttelkolben) mit und ohne Nachbehandlung.....	82
Abbildung 3.28: C-PAGE des Enzymaktivitätstests, Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung (40% - 80%).....	82
Abbildung 3.29: Bioreaktorkultivierung von MW-C3 (pH reguliert bei 7,0).....	84
Abbildung 3.30: C-PAGE des Enzymaktivitätstests der Überstandsproben aus der Bioreaktorkultivierung.....	85
Abbildung 3.31: SDS-PAGE der Proteinaufarbeitung Bioreaktor.....	86
Abbildung 3.32: C-PAGE der enzymatischen Spaltung mit angereicherter Enzymlösung [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung] aus dem Bioreaktor-Ansatz.....	87
Abbildung 3.33: C-PAGE nach enzymatischer Spaltung.....	88
Abbildung 3.34: Infrarotspektren der Fraktion <50 kDa und >50 kDa nach enzymatischer Hydrolyse mit Enzymlösung aus dem Bioreaktor. Vor Entsalzung. [TU Kaiserslautern].....	89
Abbildung 3.35: Elugramm von zwei Fucoidanen ( <i>Fucus vesiculosus</i> und <i>Laminaria digitata</i> ). Molekulargewichte einzelner Peaks siehe Tabelle 3.18.....	90
Abbildung 3.36: Elugramme der Oligosaccharide, erhalten durch die enzymatische Spaltung des Fucoidans von <i>Fucus vesiculosus</i> (50 kDa Ultrafiltrat).....	91
Abbildung 4.1: Schema des Fructose- und Mannose-Stoffwechsels (KEGG Datenbank (Kanehisa <i>et al.</i> , 2010)). Ziffern geben die EC-Nummern der Enzym, die die Reaktion durchführen, an.....	101
Abbildung 10.1: Untersuchte Substrate bei der Verwendung von PM1 Platten des Biolog® Systems.....	XIX
Abbildung 10.2: Überlagerung der Messdaten von PM1 Platten des Biolog® Systems.....	XIX
Abbildung 10.3: Untersuchte Substrate bei der Verwendung von PM2A Platten des Biolog® Systems.....	XX
Abbildung 10.4: Überlagerung der Messdaten von PM2A Platten des Biolog® Systems.....	XX
Abbildung 10.5: Untersuchte Substrate bei der Verwendung von PM3B Platten des Biolog® Systems.....	XXI
Abbildung 10.6 Überlagerung der Messdaten von PM3B Platten des Biolog® Systems.....	XXI

Abbildung 10.7: Untersuchte Substrate bei der Verwendung von PM4A Platten des Biolog® Systems .....	XXII
Abbildung 10.8 Überlagerung der Messdaten von PM4A Platten des Biolog® Systems ..	XXII
Abbildung 10.9: Bioreaktorkultivierung von MW-C3 (pH unreguliert).....	XXIV
Abbildung 10.10: C-PAGE des Enzymaktivitätstests der Überstandsproben aus der Bioreaktorkultivierung (pH unreguliert). ....	XXIV
Abbildung 10.11: SDS-PAGE der Aufreinigung. Filtrat 5 kDa (1), Retentat 5 kDa (2), Retentat 100 kDa (3), Filtrat 100 kDa (4), Filtrat 10 kDa (5), Enzymlösung Bioreaktor (6) .....	XXV

## 10 Anhang

### Elementaranalyse

**Tabelle 10.1: Messdaten Elementaranalyse Fucoidan (*Fucus vesiculosus*) in Dreifachbestimmung**  
[TU Braunschweig, Institut für Pharmazeutische Chemie]

	Probe 1 (mg)	Probe 2 (mg)	Probe 3 (mg)	Ø (mg)				
	1,354	1,268	1,260	1,294				
Element	(%)				(-)	m (g)	n (mol)	mol. Verhält.
C	22,43	22,68	22,67	22,593	0,2259	$2,924 \cdot 10^{-4}$	$2,44 \cdot 10^{-5}$	1,000
H	4,23	4,06	4,37	4,220	0,0422	$5,461 \cdot 10^{-5}$	$5,46 \cdot 10^{-5}$	2,241
N	0,18	0,20	0,19	0,190	0,0019	$2,459 \cdot 10^{-6}$	$1,76 \cdot 10^{-7}$	0,007
S	7,66	7,81	7,77	7,747	0,0775	$1,002 \cdot 10^{-4}$	$3,13 \cdot 10^{-6}$	0,129

**Tabelle 10.2: Messdaten Elementaranalyse Fucoidan (*Laminaria digitata*) in Dreifachbestimmung** [TU Braunschweig, Institut für Pharmazeutische Chemie]

	Probe 1 (mg)	Probe 2 (mg)	Probe 3 (mg)	Ø (mg)				
	1,354	1,268	1,260	1,294				
Element	(%)				(-)	m (g)	n (mol)	mol. Verhält.
C	21,74	21,59	21,73	21,687	0,2169	$2,604 \cdot 10^{-4}$	$2,20 \cdot 10^{-5}$	1,000
H	3,93	3,84	4,13	3,967	0,0397	$5,829 \cdot 10^{-5}$	$4,83 \cdot 10^{-5}$	2,195
N	0,42	0,44	0,46	0,004	0,0044	$5,356 \cdot 10^{-6}$	$3,83 \cdot 10^{-7}$	0,017
S	8,21	8,40	8,46	8,357	0,0836	$1,017 \cdot 10^{-4}$	$3,18 \cdot 10^{-6}$	0,145

**Tabelle 10.3: verwandte Typstämme von MW-C3 auf Basis von Datenbanksuche**  
(<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)

Name	Bezeichnung	Accessionnr.	Sequenzidentität %
<i>Lutibacter litoralis</i>	CL-TF09	AY962293	91.3
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	IFO 15946	AB078057	91.27
<i>Polaribacter dokdonensis</i>	DSW-5	DQ004686	90.93
<i>Tenacibaculum discolor</i>	LL0411.1.1	AM411030	90.78
<i>Tenacibaculum litoreum</i>	CL-TF13	AY962294	90.72
<i>Tenacibaculum aestuarii</i>	SMK-4	DQ314760	90.49
<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	A37.1	AM746477	90.45
<i>Tenacibaculum soleae</i>	LL04 12.1.7	AM746476	90.26
<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	MBIC1140	AB032501	90.25
<i>Polaribacter franzmannii</i>	301	U14586	90.19
<i>Tenacibaculum crassostreae</i>	JO-1	EU428783	90.19
<i>Polaribacter filamentus</i>	215	U73726	90.16
<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>	a4	EF416572	90.08
<i>Tenacibaculum lutimaris</i>	TF-26	AY661691	89.88
<i>Actibacter sediminis</i>	JC2129	EF670651	89.74
<i>Tenacibaculum amycolyticum</i>	MBIC4355	AB032505	89.73
<i>Polaribacter irgensii</i>	23-P	M61002	89.71
<i>Tenacibaculum adriaticum</i>	B390	AM412314	89.66
<i>Tenacibaculum skagerrakense</i>	D30	AF469612	89.53
<i>Polaribacter butkevichii</i>	KMM 3938	AY189722	89.31

**Tabelle 10.4: Verwandte Stämme von MW-C3 auf Basis von Datenbanksuche**  
(<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)

Name	Bezeichnung	Accessionnr.	Sequenzidentität %
<i>Flavobacteriaceae</i> bacterium	CZ1127	FJ526380	96.92
<i>Flavobacteriaceae</i> bacterium	SA-0082	AB057592	96.5
<i>Flavobacteriaceae</i> bacterium	KLE1008	GQ262725	95.78
<i>Flavobacteriaceae</i> bacterium	HDJ3	HM856617	95.45
<i>Tenacibaculum soleae</i>	a467	AM989481	91.62
<i>Tenacibaculum</i> sp.	5137_F112_F_98	GU124762	91.59
<i>Polaribacter dokdonensis</i>	MED152	DQ481463	91.23
<i>Flavobacteria</i> bacterium	Yb011	AB496665	91.21
<i>Polaribacter</i> sp.	MOLA 340	AM945570	91.19
marine bacterium	JL-S10	AY745862	91.09
<i>Polaribacter</i> sp.	J10-4	FJ425216	90.94
<i>Polaribacter</i> sp.	K20-5	HM010403	90.71
<i>Polaribacter</i> sp.	BSw20012	EU330381	90.7
<i>Polaribacter</i> sp.	BSw20011	EU365593	90.7
<i>Tenacibaculum</i> sp.	HJ103	DQ660385	90.64
<i>Polaribacter</i> sp.	BSw20012b	FJ196065	90.63
Arctic sea ice bacterium	ARK10048	AF468409	90.54
<i>Polaribacter irgensii</i>	S2-53	AY771712	90.51
<i>Tenacibaculum</i> sp.	5133_F78_gulcer_98	GU124766	90.48
<i>Tenacibaculum</i> sp.	5138_F16_98_F98_98	GU124761	90.46

## API 20 NE

Tabelle 10.5: Übersicht der Nachweisreaktionen von AP 20 NE Teststreifen

Test	Aktive Bestandteile	Reaktionen/Enzyme
NO3	Kaliumnitrat	Nitratreduktion zu Nitrit Nitratreduktion zu Stickstoff
TRP	L-Tryptophan	Indolbildung
GLU	D-Glucose	Fermentation
ADH	L-Arginin	Argininhydrolase
URE	Harnstoff	Urease
ESC	Aesculin/Eisencitrat	Hydrolyse (beta-Glucosidase)
GEL	Gelatine	Hydrolyse (Protease)
PNPG	4-Nitrophenyl-beta-D-Galactopyranosid	Beta-Glukosidase
GLU	D-Glucose	Assimilation (Glucose)
ARA	L-Arabinose	Assimilation (Arabinose)
MNE	D-Mannose	Assimilation (Mannose)
MAN	D-Mannitol	Assimilation (Mannitol)
NAG	N-Acetylglucosamin	Assimilation (N-Acetylglucosamin)
MAL	D-Maltose	Assimilation (D-Maltose)
GNT	Kaliumgluconat	Assimilation (Kaliumgluconat)
CAP	Caprinsäure	Assimilation (Caprinsäure)
ADI	Adipinsäure	Assimilation (Adipinsäure)
MLT	Apfelsäure	Assimilation (Apfelsäure)
CIT	Trinatriumcitrat	Assimilation (Trinatriumcitrat)
PAC	Phenylacetat	Assimilation (Phenylacetat)

## API ZYM

Tabelle 10.6: Übersicht der Nachweisreaktionen von API ZYM Teststreifen

Nr.	Enzymnachweis	Substrat
1	Kontrolle	
2	Alkalische Phosphatase	2-Naphtylphosphat
3	Esterase (C4)	2-Naphtylbutyrat
4	Esterase Lipase (C8)	2-Naphtylcaprylat
5	Lipase (C14)	2-Naphtylmyristat
6	Leucin Arylamidase	L-leucyl-2-naphtylamid
7	Valin Arylamidase	L-valyl-2-naphtylamid
8	Cystin Arylamidase	L-cystyl-2-naphtylamid
9	Trypsin	N-benzoyl-DL-arginin-2-naphtylamid
10	Alpha-Chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanin-2-naphtylamid
11	Saure Phosphatase	2-Naphtylphosphat
12	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphtol-AS-BI-phosphat
13	$\alpha$ -Galactosidase	6-Br-2-naphtyl- $\alpha$ D-Galactopyranosid
14	$\beta$ -Galactosidase	2-Naphtyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
15	$\beta$ -Glucuronidase	Naphtol-AS-BI- $\beta$ D-Glucuronid
16	$\alpha$ -Glucosidase	2-Naphtyl- $\alpha$ D-Glucopyranosid
17	$\beta$ -Glucosidase	6-Br-2-naphtyl- $\beta$ D-Glucopyranosid
18	N-acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase	1-Naphtyl-N-acetyl- $\beta$ D-Glucosamid
19	$\alpha$ -Mannosidase	6-Br-2-naphtyl- $\alpha$ D-mannopyranosid
20	$\alpha$ -Fucosidase	2-Naphtyl- $\alpha$ L-fucopyranosid



## Übersicht der Substrate der PhenoType MicroArrays

A1 Negative Control	A2 L-Arabinose	A3 N-Acetyl-D- Glucosamine	A4 D-Saccharic Acid	A5 Succinic Acid	A6 D-Galactose	A7 L-Aspartic Acid	A8 L-Proline	A9 D-Alanine	A10 D-Trehalose	A11 D-Mannose	A12 Dulcitol
B1 D-Serine	B2 D-Sorbitol	B3 Glycerol	B4 L-Fucose	B5 D-Glucuronic Acid	B6 D-Gluconic Acid	B7 D,L- $\alpha$ -Glycerol- Phosphate	B8 D-Xylose	B9 L-Lactic Acid	B10 Formic Acid	B11 D-Mannitol	B12 L-Glutamic Acid
C1 D-Glucose-6- Phosphate	C2 D-Galactonic Acid- $\gamma$ -Lactone	C3 D,L-Malic Acid	C4 D-Ribose	C5 Tween 20	C6 L-Rhamnose	C7 D-Fructose	C8 Acetic Acid	C9 $\alpha$ -D-Glucose	C10 Maltose	C11 D-Melibiose	C12 Thymidine
D-1 L-Asparagine	D2 D-Aspartic Acid	D3 D-Glucosaminic Acid	D4 1,2-Propanediol	D5 Tween 40	D6 $\alpha$ -Keto-Glutaric Acid	D7 $\alpha$ -Keto-Butyric Acid	D8 $\beta$ -Methyl-D- Galactoside	D9 $\alpha$ -D-Lactose	D10 Lactulose	D11 Sucrose	D12 Uridine
E1 L-Glutamine	E2 M-Tartaric Acid	E3 D-Glucose-1- Phosphate	E4 D-Fructose-6- Phosphate	E5 Tween 80	E6 $\alpha$ -Hydroxy Glutaric Acid- $\gamma$ - Lactone	E7 $\alpha$ -Hydroxy Butyric Acid	E8 $\beta$ -Methyl-D- Glucoside	E9 Adonitol	E10 Maltotriose	E11 2-Deoxy Adenosine	E12 Adenosine
F1 Glycyl-L- Aspartic Acid	F2 Citric Acid	F3 M-Inositol	F4 D-Threonine	F5 Fumaric Acid	F6 Bromo Succinic Acid	F7 Propionic Acid	F8 Mucic Acid	F9 Glycolic Acid	F10 Glyoxylic Acid	F11 D-Cellobiose	F12 Inosine
G1 Glycyl-L- Glutamic Acid	G2 Tricarballic Acid	G3 L-Serine	G4 L-Threonine	G5 L-Alanine	G6 L-Alanyl- Glycine	G7 Acetoacetic Acid	G8 N-Acetyl- $\beta$ -D- Mannosamine	G9 Mono Methyl Succinate	G10 Methyl Pyruvate	G11 D-Malic Acid	G12 L-Malic Acid
H1 Glycyl-L- Proline	H2 p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H3 m-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H4 Tyramine	H5 D-Psicose	H6 L-Lyxose	H7 Glucuronamide	H8 Pyruvic Acid	H9 L-Galactonic Acid- $\gamma$ -Lactone	H10 D-Galacturonic Acid	H11 Phenylethyl- amine	H12 2-Aminoethanol

Abbildung 10.1: Untersuchte Substrate bei der Verwendung von PM1 Platten des Biolog® Systems



Abbildung 10.2: Überlagerung der Messdaten von PM1 Platten des Biolog® Systems

A1 Negative Control	A2 Chondroitin Sulfate C	A3 $\alpha$ -Cyclodextrin	A4 $\beta$ -Cyclodextrin	A5 $\gamma$ -Cyclodextrin	A6 Dextrin	A7 Gelatin	A8 Glycogen	A9 Inulin	A10 Laminarin	A11 Mannan	A12 Pectin
B1 N-Acetyl-D- Galactosamine	B2 N-Acetyl- Neuraminic Acid	B3 $\beta$ -D-Allose	B4 Amygdalin	B5 D-Arabinose	B6 D-Arabitol	B7 L-Arabitol	B8 Arbutin	B9 2-Deoxy-D- Ribose	B10 I-Erythritol	B11 D-Fucose	B12 3-O- $\beta$ -D- Galacto- pyranosyl-D- Arabinose
C1 Gentiobiose	C2 L-Glucose	C3 Lactitol	C4 D-Melezitose	C5 Maltitol	C6 $\alpha$ -Methyl-D- Glucoside	C7 $\beta$ -Methyl-D- Galactoside	C8 3-Methyl Glucose	C9 $\beta$ -Methyl-D- Glucuronic Acid	C10 $\alpha$ -Methyl-D- Mannoside	C11 $\beta$ -Methyl-D- Xyloside	C12 Palatinose
D1 D-Raffinose	D2 Salicin	D3 Sedoheptulosa n	D4 L-Sorbose	D5 Stachyose	D6 D-Tagatose	D7 Turanose	D8 Xylitol	D9 N-Acetyl-D- Glucosaminitol	D10 $\gamma$ -Amino Butyric Acid	D11 $\delta$ -Amino Valeric Acid	D12 Butyric Acid
E1 Capric Acid	E2 Caproic Acid	E3 Citraconic Acid	E4 Citramalic Acid	E5 D-Glucosamine	E6 2-Hydroxy Benzoic Acid	E7 4-Hydroxy Benzoic Acid	E8 $\beta$ -Hydroxy Butyric Acid	E9 $\gamma$ -Hydroxy Butyric Acid	E10 $\alpha$ -Keto Valeric Acid	E11 Itaconic Acid	E12 5-Keto-D- Gluconic Acid
F1 D-Lactic Acid Methyl Ester	F2 Malonic Acid	F3 Melibionc Acid	F4 Oxalic Acid	F5 Oxalomalic Acid	F6 Quinic Acid	F7 D-Ribono-1,4- Lactone	F8 Sebacic Acid	F9 Sorbic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 D-Tartaric Acid	F12 L-Tartaric Acid
G1 Acetamide	G2 L-Alaninamide	G3 N-Acetyl-L- Glutamic Acid	G4 L-Arginine	G5 Glycine	G6 L-Histidine	G7 L-Homoserine	G8 Hydroxy-L- Proline	G9 L-Isoleucine	G10 L-Leucine	G11 L-Lysine	G12 L-Methionine
H1 L-Ornithine	H2 L-Phenylalanine	H3 L-Pyroglutamic Acid	H4 L-Valine	H5 D,L-Carnitine	H6 Sec-Butylamine	H7 D,L- Octopamine	H8 Putrescine	H9 Dihydroxy Acetone	H10 2,3-Butanediol	H11 2,3-Butanone	H12 3-Hydroxy 2- Butanone

Abbildung 10.3: Untersuchte Substrate bei der Verwendung von PM2A Platten des Biolog® Systems

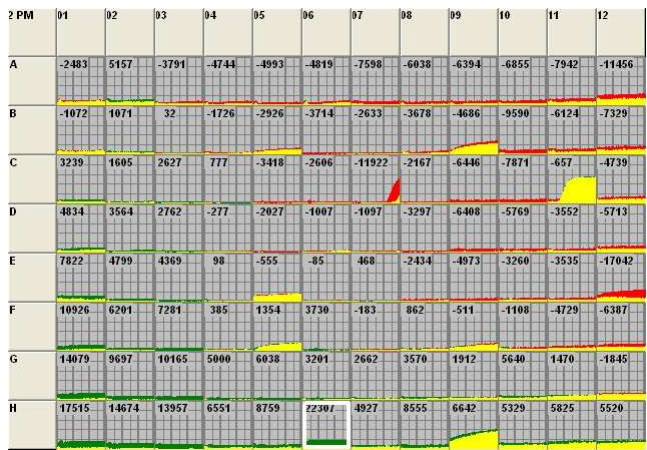


Abbildung 10.4: Überlagerung der Messdaten von PM2A Platten des Biolog® Systems

A1 Negative Control	A2 Ammonia	A3 Nitrite	A4 Nitrate	A5 Urea	A6 Biuret	A7 L-Alanine	A8 L-Arginine	A9 L-Asparagine	A10 L-Aspartic Acid	A11 L-Cysteine	A12 L-Glutamic Acid
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L-Phenylalanine	B9 L-Proline	B10 L-Serine	B11 L-Threonine	B12 L-Tryptophan
C1 L-Tyrosine	C2 L-Valine	C3 D-Alanine	C4 D-Asparagine	C5 D-Aspartic Acid	C6 D-Glutamic Acid	C7 D-Lysine	C8 D-Serine	C9 D-Valine	C10 L-Citrulline	C11 L-Homoserine	C12 L-Ornithine
D-1 N-Acetyl-D,L- Glutamic Acid	D2 N-Phthaloyl-L- Glutamic Acid	D3 L-Pyroglutamic Acid	D4 Hydroxylamine	D5 Methylamine	D6 N-Amylamine	D7 N-Butylamine	D8 Ethylamine	D9 Ethanolamine	D10 Ethylenediamin e	D11 Putrescine	D12 Agmatine
E1 Histamine	E2 $\beta$ -Phenylethyl- amine	E3 Tyramine	E4 Acetamide	E5 Formamide	E6 Glucuronamide	E7 D,L-Lactamide	E8 D-Glucosamine	E9 D- Galactosamine	E10 D- Mannosamine	E11 N-Acetyl-D- Glucosamine	E12 N-Acetyl-D- Galactosamine
F1 N-Acetyl-D- Mannosamine	F2 Adenine	F3 Adenosine	F4 Cytidine	F5 Cytosine	F6 Guanine	F7 Guanosine	F8 Thymine	F9 Thymidine	F10 Uracil	F11 Uridine	F12 Inosine
G1 Xanthine	G2 Xanthosine	G3 Uric Acid	G4 Alloxan	G5 Allantoin	G6 Parabanic Acid	G7 D,L- $\alpha$ -Amino-N- Butyric Acid	G8 $\gamma$ -Amino-N- Butyric Acid	G9 $\epsilon$ -Amino-N- Caproic Acid	G10 D,L- $\alpha$ -Amino- Caprylic Acid	G11 $\delta$ -Amino-N- Valeric Acid	G12 $\alpha$ -Amino-N- Valeric Acid
H1 Ala-Asp	H2 Ala-Gln	H3 Ala-Glu	H4 Ala-Gly	H5 Ala-His	H6 Ala-Leu	H7 Ala-Thr	H8 Gly-Asn	H9 Gly-Gln	H10 Gly-Glu	H11 Gly-Met	H12 Met-Ala

Abbildung 10.5: Untersuchte Substrate bei der Verwendung von PM3B Platten des Biolog® Systems

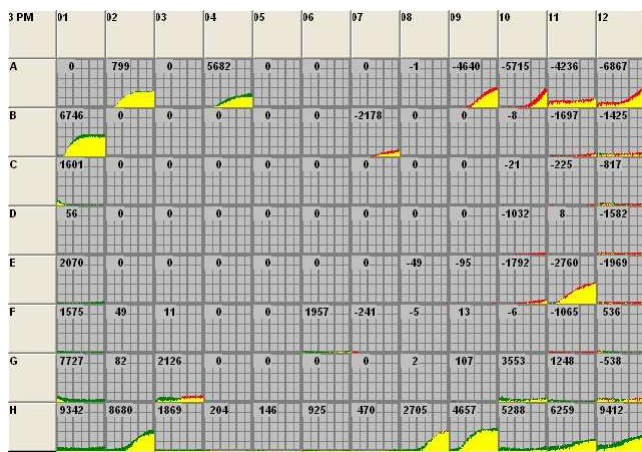


Abbildung 10.6 Überlagerung der Messdaten von PM3B Platten des Biolog® Systems

A1 Negative Control	A2 Phosphate	A3 Pyrophosphate	A4 Trimeta- phosphate	A5 Tripoly- phosphate	A6 Triethyl Phosphate	A7 Hypophosphite	A8 Adenosine- 2'- monophosphate	A9 Adenosine- 3'- monophosphate	A10 Adenosine- 5'- monophosphate	A11 Adenosine- 2',3'-cyclic monophosphate	A12 Adenosine- 3',5'-cyclic monophosphate
B1 Thiophosphate	B2 Dithiophosphat e	B3 D,L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate	B4 $\beta$ -Glycerol Phosphate	B5 Carbamyl Phosphate	B6 D-2-Phospho- Glyceric Acid	B7 D-3-Phospho- Glyceric Acid	B8 Guanosine- 2'- monophosphate	B9 Guanosine- 3'- monophosphate	B10 Guanosine- 5'- monophosphate	B11 Guanosine- 2',3'-cyclic monophosphate	B12 Guanosine- 3',5'-cyclic monophosphate
C1 Phosphoenol Pyruvate	C2 Phospho- Glycolic Acid	C3 D-Glucose-1- Phosphate	C4 D-Glucose-6- Phosphate	C5 2-Deoxy-D- Glucose 6- Phosphate	C6 D- Glucosamine-6- Phosphate	C7 6-Phospho- Gluconic Acid	C8 Cytidine- 2'- monophosphate	C9 Cytidine- 3'- monophosphate	C10 Cytidine- 5'- monophosphate	C11 Cytidine- 2',3'- cyclic monophosphate	C12 Cytidine- 3',5'- cyclic monophosphate
D1 D-Mannose-1- Phosphate	D2 D-Mannose-6- Phosphate	D3 Cysteamine-S- Phosphate	D4 Phospho-L- Arginine	D5 O-Phospho-D- Serine	D6 O-Phospho-L- Serine	D7 O-Phospho-L- Threonine	D8 Uridine- 2'- monophosphate	D9 Uridine- 3'- monophosphate	D10 Uridine- 5'- monophosphate	D11 Uridine- 2',3'- cyclic monophosphate	D12 Uridine- 3',5'- cyclic monophosphate
E1 O-Phospho-D- Tyrosine	E2 O-Phospho-L- Tyrosine	E3 Phosphocreatin e	E4 Phosphoryl Choline	E5 O-Phosphoryl- Ethanolamine	E6 Phosphono Acetic Acid	E7 2-Aminoethyl Phosphonic Acid	E8 Methylene Diphosphonic Acid	E9 Thymidine- 3'- monophosphate	E10 Thymidine- 5'- monophosphate	E11 Inositol Hexaphosphate	E12 Thymidine 3',5'- cyclic monophosphate
F1 Negative Control	F2 Sulfate	F3 Thiosulfate	F4 Tetrathionate	F5 Thiophosphate	F6 Dithiophosphat e	F7 L-Cysteine	F8 D-Cysteine	F9 L-Cysteinyl- Glycine	F10 L-Cysteic Acid	F11 Cysteamine	F12 L-Cysteine Sulfinic Acid
G1 N-Acetyl-L- Cysteine	G2 S-Methyl-L- Cysteine	G3 Cystathionine	G4 Lanthionine	G5 Glutathione	G6 D,L-Ethionine	G7 L-Methionine	G8 D-Methionine	G9 Glycyl-L- Methionine	G10 N-Acetyl-D,L- Methionine	G11 L-Methionine Sulfoxide	G12 L-Methionine Sulfone
H1 L-Djenkolic Acid	H2 Thiourea	H3 1-Thio- $\beta$ -D- Glucose	H4 D,L-Lipoamide	H5 Taurocholic Acid	H6 Taurine	H7 Hypotaurine	H8 p-Amino Benzene Sulfonic Acid	H9 Butane Sulfonic Acid	H10 2- Hydroxyethane Sulfonic Acid	H11 Methane Sulfonic Acid	H12 Tetramethylene Sulfone

Abbildung 10.7: Untersuchte Substrate bei der Verwendung von PM4A Platten des Biolog® Systems

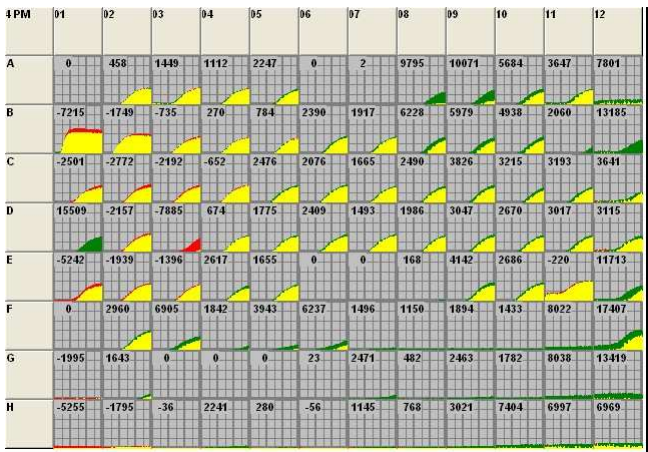
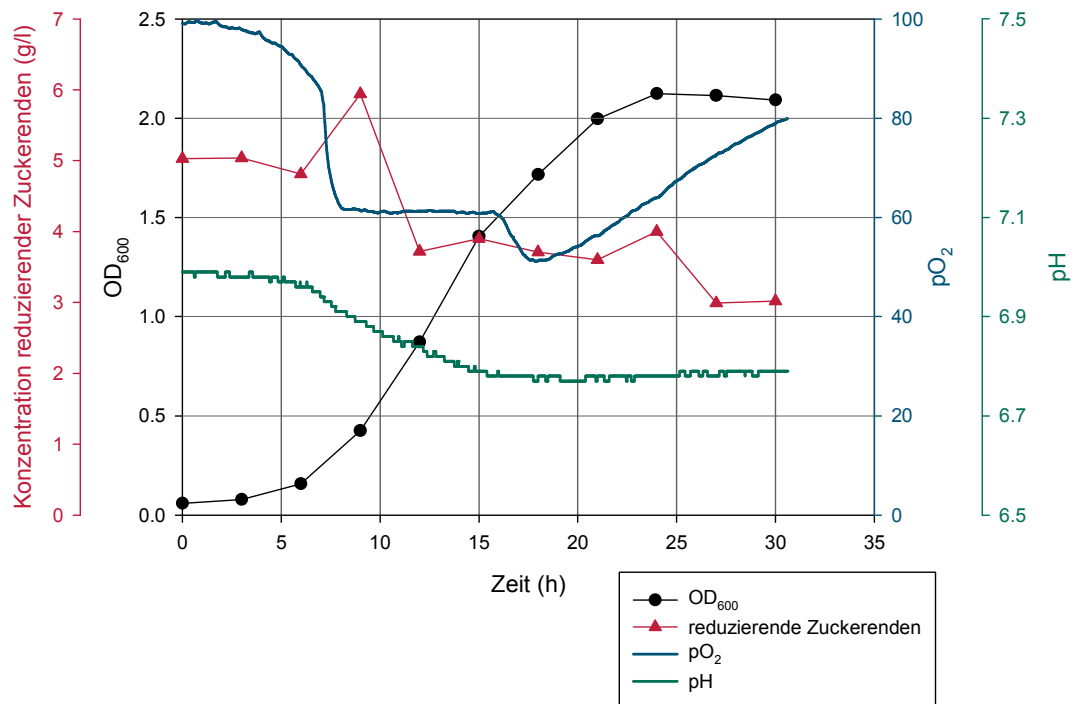


Abbildung 10.8 Überlagerung der Messdaten von PM4A Platten des Biolog® Systems

## Übersicht der 16S rDNA von Isolat MW-C3

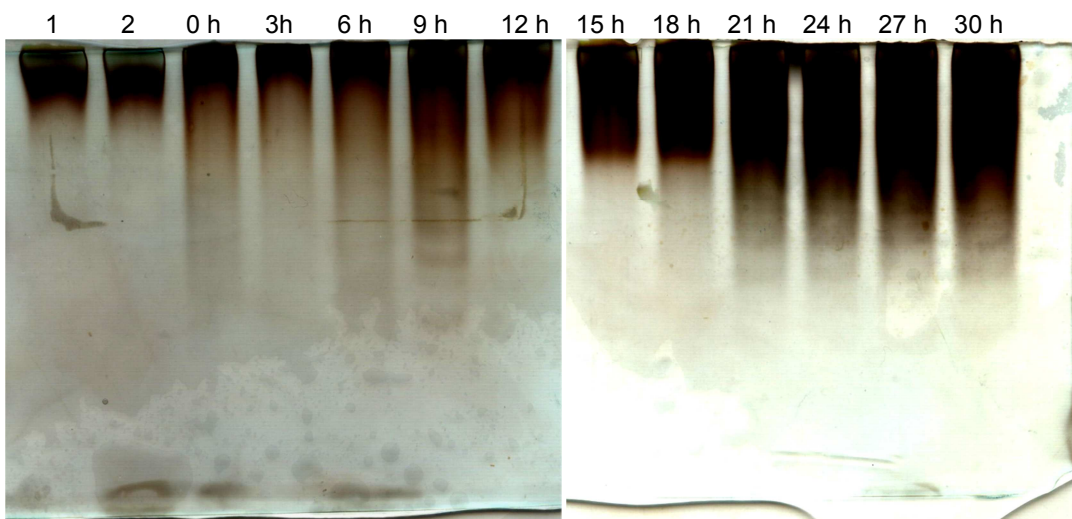
1	TCAGGATGAA	CGCTAGCGGC	AGGCCTAACA	CATGCAAGTC	GAGGGGTAAC
2	ATAAGAGAGC	TTGCTTTTTT	GATGACGACC	GGCGCACGGG	TGCGTAACGC
3	GTATAGAACC	TACCTTAAAC	AGAGGGATAC	CCCATGGAAA	CGTGGACTAA
4	TATCTCATGG	TGTTATAGAG	AGGCATCTTT	TTATAATTAA	AGATTTATCG
6	GTTTAAGATG	GCTATGCGTC	CTATTAGTTA	GTTGGTAAGG	TAACGGCTTA
7	CCAAGACATC	GATAGGTAGG	GGTCCTGAGA	GGGAGATCCC	CCACACTGGT
8	ACTGAGACAC	GGACCAGACT	CCTACGGGAG	GCAGCAGTGA	GGAATATTGG
9	TCAATGGAGG	CAACTCTGAA	CCAGCCATGC	CGCGTGAAGG	ATGACTGCCC
10	TATGGGTTGT	AAACTTCTTT	TATATGGGAA	GAACTACAGT	TACGTGTAAT
11	TGTTTGACGG	TACCATACGA	ATAAGGACCG	GCTAACTCCG	TGCCAGCAGC
12	CGCGGTAATA	CGGAGGGTCC	AAGCGTTATC	CGGGAATCAT	TGGGTTTAAA
13	GGGTTTCGTAG	GCGGGCTAAT	CAGTCAGAGG	TGAAATCCAG	CAGCTTAACT
14	GTTGAACTGC	CTTTGATACT	GTTAGTCTTG	AGTCATATGG	AAGTGGATAG
15	AATATGTAGT	GTAGCGGTGA	AATGCATAGA	TATTACATAG	AATACCGATT
16	GCGAAGGCAG	TCCACTACGT	ATCGACTGAC	GCTGATGAAC	GAAAGCGTGG
17	GGAGCGAACG	GGATTAGATA	CCCCGGTAGT	CCACGCCGTA	AACGATGGAC
18	ACTAGTTGTT	GGGTTTCGGC	TCAGTGACTA	AGCGAAAGTG	ATAAGTGTCC
19	CACCTGGGGA	GTACGGTCGC	AAGATTGAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGG
20	CCCGCACAAAG	CGGTGGAGCA	TGTGGTTTTAA	TTCGATGATA	CGCGAGGAAC
21	CTTACCAGGG	CTTAAATGTA	GGATGCATTA	GTTAGAGATA	GCTATTTCTT
22	CGGACTTCTT	ACAAGGTGCT	GCATGGTTGT	CGTCAGCTCG	TGCCGTGAGG
23	TGTCAGGTTA	AGTCCTATAA	CGAGCGCAAC	CCCTATTTTTT	AGTTGCTAAC
24	AGGTTAAGCT	GAGGACTCTA	GAGAGACTGC	CGGTGCAAAC	CGTGAGGAAG
25	GTGGGGATGA	CGTCAAATCA	TCACGGCCCT	TACGTCCTGG	GCTACACACG
26	TGCTACAATG	GCAATGACAG	AGGGCAGCTA	CCTGGCGACA	GGATGCAAAT
27	CTTTAAACAT	TGTCACAGTT	CGGATTGGAG	TCTGCAACTC	GACTCCATGA
28	AGCTGGAATC	GCTAGTAATC	GGATATCAGC	CATGATCCGG	TGAATACGTT
29	CCCGGGCCTT	GTACACACCG	CCCGTCAAGC	CATGGAAGCT	GGGGGTGCCT
30	GAAGTCGGTC	ACCGCAAGGA	GCCGCCTAGG	GTAAAACCTGG	TAACTAGGGC
31	TAAGTC				

## Bioreaktorkultivierung von Isolat MW-C3



**Abbildung 10.9: Bioreaktorkultivierung von MW-C3 (pH unreguliert).**

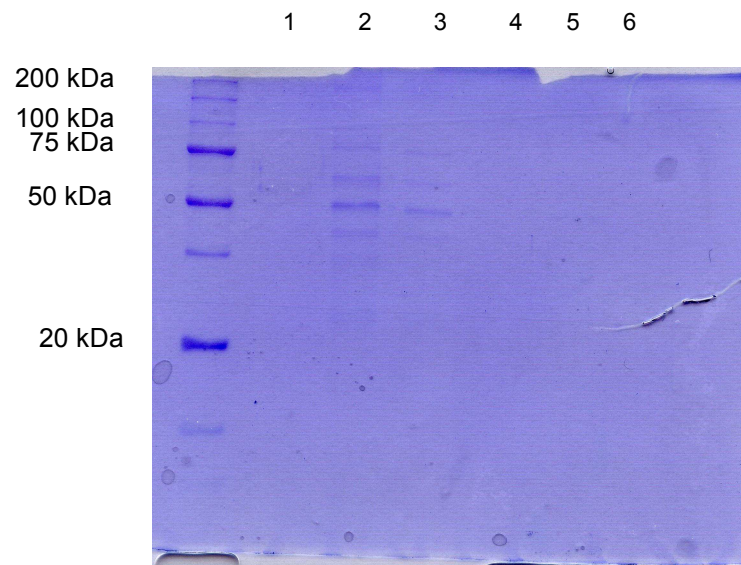
Bedingungen: 3 L-Bioreaktorkultur; ASW-Medium: Glucose (5 g/l) und Fucoidan (0,2 g/l), Ammoniumsulfat (1,57 mM); 50 mM MOPS (pH 7,0), 25 °C, Belüftung von 0,5 l l<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. Regulierung der Drehzahl (200-800 rpm) bei Unterschreiten eines pO<sub>2</sub> < 30%.



**Abbildung 10.10: C-PAGE des Enzymaktivitätstests der Überstandsproben aus der Bioreaktorkultivierung (pH unreguliert).**

Enzymaktivitätstest: 300 µl Enzymlösung + 100 µl Substrat bei 25 °C; Spur 1: Fucoidanlösung, Spur 2: Nullprobe. Bereich A: hochmolekulares Fucoidan, Bereich B: Laufweite von Phenolrot; die Zeitangaben beziehen sich auf die Kultivierungsdauer des Bioreaktors.





**Abbildung 10.11: SDS-PAGE der Aufreinigung.** Filtrat 5 kDa (1), Retentat 5 kDa (2), Retentat 100 kDa (3), Filtrat 100 kDa (4), Filtrat 10 kDa (5), Enzymlösung Bioreaktor (6)